

Kolonizáció és adaptáció stygobiont fajoknál

Doktori értekezés

írta: Balázs Gergely

Témavezetők:

Dr. Herczeg Gábor, egyetemi tanár, az MTA doktora

Dr. Török János, egyetemi tanár, az MTA doktora

ELTE Biológiai Doktori Iskola

Iskolavezető: Prof. Dr. Erdei Anna

Zootaxonómia, állatökológia, hidrobiológia Program

Programvezető: Prof. Dr. Török János



Budapest, 2019

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés.....	5
1.1. A barlangokban található élőlények	
osztályozása, és annak történeti háttere.....	5
1.2. A mérsékelt égövi diverzitás.....	11
1.3. A magyarországi barlangbiológia történeti áttekintése.....	12
1.4. Magyarországi régiók barlangi élőhelyeinek ismertetése.....	16
1.5. Barlangi adaptáció, troglomorfózis és a kolonizációs elméletek.....	20
1.6. A hazai stygobiont fajok áttekintése.....	26
2. Célkitűzés.....	29
3. A hazai <i>Niphargus</i> fajok taxonómiai helyzetének vizsgálata.....	31
3.1. A téma ismertetése.....	31
3.2. Anyag és módszer.....	34
3.3. Eredmények.....	35
3.3.1. A történeti Magyarország területéről leírt <i>Niphargus</i> fajok,	
melyek hazai előfordulása nem valószínű.....	36
3.3.2 Téves határozás vagy taxonómiai változás okán	
faunalistánkból kizárt <i>Niphargus</i> fajok.....	38
3.3.3. Kétséges taxonómiai helyzetű <i>Niphargus</i> fajok.....	41
3.3.4. Hazai előfordulású valid <i>Niphargus</i> fajok.....	43
3.3.5. Egyéb lehetséges fajok.....	48
3.4. Diskusszó.....	49
4. A hazai <i>Niphargus</i> fajok filogenetikai vizsgálata.....	51
4.1. A téma ismertetése.....	51
4.2. Anyag és módszer	53
4.2.1. Gyűjtések.....	53

4.2.2. DNS kivonás és PCR.....	54
4.2.3. Adatelőkészítés, és feldolgozás.....	55
4.3. Eredmények.....	56
4.4. Diskusszió.....	60
5. A Molnár János-barlang faunájának ismertetése, és a barlangban élő <i>Niphargus hrabei</i> és <i>Asellus aquaticus</i> populációk kolonizációjának és adaptációjának vizsgálata molekuláris genetikai módszerekkel.....	64
5.1. A téma ismertetése.....	64
5.1.1. A Molnár János-barlang, és makroszkopikus faunája.....	64
5.1.2. A <i>N. hrabei</i> és <i>A. aquaticus</i> populációkon végzett vizsgálatok elméleti hátterének ismertetése.....	73
5.2. Anyag és módszer.....	76
5.2.1. Mintagyűjtés.....	76
5.2.2. DNS kivonás és PCR.....	78
5.2.3. RNS kivonás és szekvenálás.....	79
5.2.4. Adatelőkészítés és feldolgozás.....	79
5.3. Eredmények.....	83
5.4. Diskusszió.....	92
6. Következtetés és kitekintés.....	97
Köszönetnyilvánítás.....	102
Összefoglalás.....	104
Summary.....	108
Irodalomjegyzék.....	112
Függelék.....	146

”Mire számtalan generáció után egy állat eléri a legmélyebb területeket, e felfogás szerint a nem használatnak köszönhetően többékevésbé teljesen elpusztulnak a szemei, a természetes kiválasztás pedig gyakran más változásokat is eszközöl, például azt, hogy az antennák vagy tapogatók a vakság ellensúlyozására meghosszabbodnak.”

Charles Darwin

On the origin of species, 1859

fordítás: Kampis György

”A természetrajzi tudományok mezején tett újabbkori számos nevezetesebb felfedezések között, kétségtől a legelső helyre sorozandók azok, melyek az életműszeres testeknek a föld rejtekében létezését napfényre hozzák.”

Frivaldszky János

Adatok a Magyarhoni barlangok faunájához, 1865

1. Bevezetés

1.1. A barlangokban található élőlények osztályozása, és annak történeti háttere

A barlangok, és a barlangokban előforduló állatok a történelem előtti idők óta fontos szerepet játszottak az emberi kultúrában, és ennek megfelelően számos hiedelem kapcsolódott hozzájuk. A legendákkal teletűzdelt érdeklődés egészen sokáig hátráltatta a tudományos megismerést. Az első biztosan barlangi élőlényről szóló írásos feljegyzés Olaszországból származik a XVI. századból (Alberti, 1550; Hill, 1974), és meglepő módon egy parányi vakbolharákról szól. A lelőhely alapján minden valószínűség szerint a *Niphargus costozzae* SCHELLENBERG, 1935 faj egyik példányát tartotta említésre méltónak Giovanni Giorgio Trissino velencei költő (Romero, 2009). A legendák annyira élénken meghatározták később is a barlangi élőlényekről szóló ismereteket, hogy az egyik leghíresebb barlangi fajról, a barlangi vakgőtéről (*Proteus anguinus* LAURENTI, 1768) szóló első beszámolóban, a Krainai Hercegségről írott, amúgy nagyon is alapos monográfiában Valvasor (1689) sárkányivadékokként azonosította ezeket a figyelemre méltó kételtűeket. A faj tudományos leírására, és realisabb rendszertani besorolására majdnem száz évvel később került csak sor (Laurenti, 1768). A következő száz év során egyre-másra kerültek felfedezésre a barlangi állatfajok, de a barlangbiológia mint önálló tudományág csak a XIX. század közepén körvonalazódott. A szisztematikus kutatások megkezdése gyakorlatilag egyszerre történt Európában és Észak Amerikában, és mindkét helyen szorosan kötődik egy-egy nagyobb barlangrendszerhez, és a hozzájuk kapcsolódó élénk turizmushoz. Észak-Amerikában a Mammoth-barlang (Kentucky, Egyesült Államok), míg Európában a Postojnai-barlang (Adelsbergi-barlang) (Notrjanskakarsztvidék, Szlovénia) jelentette a kiindulópontot. Mivel mindkét helyen már ekkor jelentős turizmus épült ki, ezeket a barlangokat élénk érdeklődés övezte. Az újabb, és újabb járatszakaszok felfedezése nemcsak magáért a felfedezés öröméért volt fontos, hanem közvetlen bevétel-növekedést is jelenthetett a túravezetőknek. A barlangokban jelentős időt eltöltő, elkötelezett idegenvezetők figyelmét nem kerülték el a különböző barlangi élőlények sem, amelyeket az egyre jobban érdeklődő tudósok számára be is

gyűjtöttek. A különleges élőhelyi feltételek, és az ezekhez alkalmazkodott, sokszor bizarre kinézetű állatok, valamint a felfedezésre váró fajok várhatóan magas száma kecsegtető kutatási lehetőséget jelentett. A XIX. század közepétől Európában, szlovéniai központtal a fajleírások mellett nagy hangsúlyt kapott a barlangokban talált élőlények különböző alapokon nyugvó osztályozása, míg Észak-Amerikában a barlangi morfológiai adaptációk kerültek az érdeklődés középpontjába.

Az első átfogó regionális barlangi faunisztikai felmérésre Szlovéniában (Carniola) került sor. A közben szerzett tapasztalatok nyomán Jørgen Matthias Christian Schiödte (1849) dán entomológus megalkotta az első osztályozási rendszert, melyben négy kategóriát javasolt a barlangokban fellelhető élőlények csoportosítására: árnyék állatok (skygge-dyr), szürkületi állatok (tusmørke-dyr), barlangi állatok (hule-dyr) és cseppkő állatok (drypsteenshule-dyr). Jóllehet ez a rendszerezés nem állta ki az idő próbáját, mivel alig öt évvel később, egy sokkal értelmezhetőbb osztályozás látott napvilágot (Schiner, 1854), mégis ez a munka fémjelzi a barlangbiológia, mint önálló tudományterület kezdetét. Észak-Amerikában a tudományág megszületését a Mammoth-barlangból leírt teljesen vak halfaj, az *Amblyopsis spelaea* (DEKAY, 1842) kutatása jelzi (Wyman, 1843; Tellkamp, 1844). Ebben az esetben még nem beszélhetünk a mai értelemben vett barlangbiológiáról, mivel ezek a vizsgálatok arra irányultak, hogy a szemek elvesztése milyen módon megy végbe. A jelentős érdeklődés kialakulásában erős szerepet játszottak, az abban az időben elég népszerű kreacionista vonal képviselői, akik nézeteik igazolásához jó kutatási alanynak gondolták a vak barlangi állatokat (Agassiz, 1851, 1859). Érdeemes megjegyezni, hogy a bizonyos tulajdonságok visszafejlődése, elvesztése, amely a barlangi állatokra jellemző, komoly fejtörést okozott magának Charles Darwinnak (1859) is, mivel az akkoriban rendelkezésre álló ismeretek alapján a jelenség nem volt kielégítően magyarázható az elméletével. A barlangi állatok fejlődésével kapcsolatban "Lamarcki" nézeteket vallott, abból a szempontból, hogy például a szemek visszafejlődését a szerv használatának hiányára vezette vissza. A barlangokban található állatok felosztása fontos szerepet játszik a barlangbiológiában, mivel a pontos csoportosítás alapját képezi a morfológiai, fiziológiai és ökológiai vizsgálatok megfelelő értelmezésének.

A Rudolphe Schiner (1854) által javasolt, és Emile Racoviță (1907) által pontosított felosztás három kategóriát különböztet meg az alábbiak szerint (Sket, 2008 fordítása alapján):

-Trogloxen: Olyan alkalmilag a barlangokban előforduló élőlények, melyek esetlegesen fordulnak elő, és bár olykor tudatosan kerülnek be a barlangokba táplálék, vagy megfelelő klimatikus viszonyok után kutatva, ott hosszú távon nem élnek túl, és nem szaporodnak. Barlangi adaptáció semmilyen formáját nem mutatják, és általában a bejárat zónájában maradnak. Barlangbiológiai szempontból szinte semmilyen fontosságuk nincs.

-Troglophyl: Barlangokban folyamatosan előforduló élőlények, amelyek felszíni preferenciát is mutatnak. Gyakran szaporodnak a barlangokban, de előfordulnak a felszíni élőhelyeken is. Többnyire redukálódott a látószervük, és ezzel párhuzamosan fejlettebb a nem vizuális érzékelésük, ezen kívül más barlangi adaptációkat is mutathatnak. Ezek azok az élőlények, amelyekből a valódi barlangi fajok később kialakulnak, valamint ezek azok, melyek az első kolonizálói egy újonnan kialakult barlangi élőhelynek. Hasznos adatokat szolgáltatnak az adott barlangi környezet fejlődésével kapcsolatban.

-Troglobiont: Kizárólag szubterrán élőhelyen fordulnak elő, és a legmélyebb régiókat kedvelik. Jelentősen átalakult élőlények, melyek nagyfokú adaptációt mutatnak a sötétben való élethez. Ezek közül kerülnek ki a legősibb barlanglakók. Barlangbiológiai szempontból a legjelentősebb csoport.

A Schiner-Racoviță felosztás hibái ellenére mind a mai napig gyakran alkalmazott rendszerezés, legalább is a terminológia szintjén. A bevezetése óta eltelt időszakban számos próbálkozás történt javítására, finomítására, amelyek alapvetően két problémára próbáltak választ adni. Az egyik nyilvánvaló gond arra vezethető vissza, hogy egy alapvetően graduális alkalmazkodást végül lehetetlen diszkrét kategóriákba sorolni. Ez különösen látványosan tetten érhető a középső, a troglophyl kategóriánál, melyben eleve átmeneti alakok vannak. A másik probléma, mely az elsőhöz szorosan kapcsolódik, az hogy a kutatások logisztikai nehézségei miatt a barlangi fajokról, kevés kivételtől eltekintve, igen korlátozott ismeretekkel rendelkezünk, melyek főként a morfológiára korlátozódnak. A fontos életmenet -, és élettani ismeretek hiányában komoly nehézségekbe ütközhet az adaptáció mértékének eldöntése, és így a faj kategorizálása.

Leegyszerűsítve, praktikusán két problémával nézünk szembe. Az egyik a kategóriák számának elégtelensége, a másik pedig az azokba való pontos besorolás a vonatkozó ismeretek hiányában. A legkorábbi, visszhangot kiváltó lehetséges megoldás Dudich Endre nevéhez fűződik. A Baradla-barlangról szóló monográfiájában (Dudich, 1932, 211. oldal) ökológiai ismereteket is feltételezve a középső kategóriát két alkategóriára bontotta, ezzel legalább az egyik problémára megoldást kínált. Felosztásában négy kategóriát hozott létre, melyeket Tychotroglobionten, Pseudotroglobionten, Hemitroglobionten illetve Eutroglobionten nevekkkel illetett. Dudich rendszerét alapul véve Pavan (1944), és később Ruffo (1957) igen hasonló elveket követő felosztást javasolt. Ruffo visszahozta a klasszikus terminológiát, és az alábbi elnevezéseket használta: troglosseni, subtroglófil, eutroglófil, troglóbi. A rendszerezés kiegészítéseként két további kategóriát állított fel. Az egyikbe a parazitákat sorolta, míg a másikba a guanó-kolonizálók kerültek. Bár a két olasz szakember felosztása igen előremutató volt, Olaszországon kívül nem nagyon terjedt el a rendszer használata. Az Egyesült Államokban Barr (1968) egy gyakorlatilag megegyező rendszerezést javasolt, bár ő nem tette hozzá Ruffo két kiegészítő kategóriáját. Arra vonatkozólag nincs információnk, hogy Barr tudott-e Dudich felosztásáról, az viszont nagyon valószínű, hogy Pavan, és Ruffo rendszere ismeretlen volt előtte (Sket, 2008). A legszembetűnőbb, de teljesen mellékesnek tekinthető különbség a két kategorizálás (rendszerezés) között az, hogy Barr, a szerinte nem szerencsés "troglóxen (troglosseni)" helyett az "accidental (esetleges)" megnevezést javasolta. Csakúgy, mint a Ruffo-Pavan rendszer esetében Barr rendszerezése is csak az Egyesült Államokban terjedt el, ott viszont elég sokáig használatban maradt gyakorlatilag változatlanul (lásd: Holsinger & Culver, 1988). Érdemes megemlékezni Tomaselli, és Pavan rendszerezéséről (Ruffo 1957; Vandel 1965, által idézve) is. A szintén félig-meddig ökológiai megfontolásokon alapuló, azokat dichotómikus elágazási pontokként használó rendszer hét kategóriát eredményezett, amely annak ellenére, hogy sok szempont alapján tette lehetővé a beosztást, végül a praktikus alkalmazáshoz (főleg a megfelelő ismeretek gyakori hiánya miatt) túl bonyolultnak bizonyult. Teljesen más megközelítést alkalmazott Christiansen (1962), aki félretéve a majdnem mindig bizonytalan ökológiai ismereteket, csak a morfológiában is tetten érhető barlangi adaptációkat, az általa troglomorphosis néven nevezett, különböző fokú változásokat alapul véve alkotott rendszerezést. Ez az irány tetten

érhető Peck (1970) osztályozási rendszerében is, ahol a "troglophile" megnevezés helyett "facultative troglophile" szerepel, valamint a klasszikus troglobiont kategória van felosztva aszerint, hogy a fajnál kimutatható-e troglomorfózis (troglobiont), vagy nem (obligate troglophile). A Peck féle felosztás használata egyértelműsége miatt egy időben eléggé elterjedt volt főleg észak-amerikai publikációkban (pl. Peck 1989; Franz et al. 1994). A fentebb felsorolt rendszerezések mellett számos, apróbb változtatást, és finomítást tartalmazó javaslat született (pl. Clerge & Gazeau, Ginet & Decou, 1977, Thivés & Tercafs, 1972), melyek részletezését itt nem tartom szükségesnek, mivel a dolgozat további részében használt felosztás (Sket, 2008) ismertetéséhez, és kritikai értékeléséhez érdemben nem járulnak hozzá.

A Sket (2008) által javasolt felosztás napjaink a leginkább elfogadott, és leggyakrabban alkalmazott rendszerezés. Sket Dudich (1932), és Ruffo (1957) rendszerét alapul véve négy kategóriába sorolja a barlangokban fellelhető élőlényeket, szem előtt tartva a korábban elterjedt elnevezések továbbvitelét, törekedve az ökológiai szemléletre, és nem megfélekezve a praktikumról:

-**Troglobiont:** Olyan faj, mely elengedhetetlenül kötődik a földalatti (hypogean) élőhelyhez.

-**Eutroglophile:** Olyan, alapvetően felszíni (epigean) faj, mely képes tartósan fenntartani szubterrán populációt (amely esetleg troglobionttá válik).

-**Subtroglophile:** Olyan faj, mely hajlamos állandóan, vagy időszakosan előfordulni szubterrán élőhelyen, de kötődik az epigean élőhelyekhez valamilyen biológiai funkcióval (napi szinten: pl. táplálkozás, szezonálisan, vagy életmenetben: pl. szaporodás).

-**Troglophen:** Olyan faj, mely csak esetlegesen fordul elő hypogean élőhelyen, és nem képes szubterrán populációt kialakítani.

A definíciókban használt kifejezések (hypogean, szubterrán) jól érzékelhetően figyelembe veszik azt a tényt, hogy a "barlang" kifejezés erősen antropomorf felhangokkal bír, és az osztályozási rendszereket jó lenne nem e szerint limitálni. Más kérdés azonban, hogy bár a rendszerezés ilyenformán elvileg univerzálisan alkalmazható minden szubterrán élőhelyen előforduló élőlényre, a nem barlangi hypogean élőhelyek esetében, az információhiány miatt praktikusán nem feltétlenül alkalmazható a felosztás. A kérdés fontosságát jelzi, hogy léteznek olyan álláspontok is, melyek szerint

a nem barlangi szubterrán élőhelyek faunájával kapcsolatban egyáltalán nem kéne alkalmazni alapvetően barlangbiológiai kiindulású felosztási rendszert (Trajano & de Carvalho, 2017). A problémát valószínűleg ezen élőhelyekkel kapcsolatos ismeretanyagunk növekedése fogja, vagy önálló rendszerezéssel-, vagy betagozódással feloldani. Jelen dolgozat szempontjából fontosabb gyengesége a Sket-féle felosztásnak, az eutroglophile, és a troglobiont kategóriák közötti egyirányú tévedés lehetősége. Számtalan példát ismerünk, ahol egy eredetileg troglobiontként jellemzett faj esetében, később találtak epigean (felszíni) populációt. Ez a tény jól reflektál arra a módszertani nehézségre, hogy míg a barlangok jól behatárolható mintavételezési helyet jelentenek, a felszíni környezetben sokkal nehezebb a célzott mintavételezés helyeinek megfelelő kiválasztása. Érdeemes megjegyezni, hogy a különböző felosztások megítélése nem csak a rendelkezésre álló ismeretanyagot tükrözi, de alkalmazásuk földrajzi helyének függvényében is változhatnak. Például a trópusi barlangok esetében, ahol sokkal gyorsabb kolonizációs és rekolonizációs folyamatok zajlanak le, a Sket-féle felosztásnál sokkal pontosabban alkalmazható Trajano, és De Calvaho (2017) rendszerezése, melyben a trópusi barlangokban gyakori, a barlangok forrásait időszakosan hasznosító fajok, populációk hangsúlyosabb szerepet kapnak (Trajano, 2012; Trajano et al., 2016).

A vízben élő troglobiontok elterjedt elnevezése a stygobiont. A stygobiont kifejezés használatának megítélése változó. Ennek legfőbb oka az, hogy kétféle alkalmazás képzelhető el. Az egyik esetében a "troglobiont", és "stygobiont" megnevezés egyenrangú kategóriaként jelenik meg (de klasszifikációs szempontból azonos definícióval), és kizárólagosságot tételez fel. Ebben az esetben tehát az a faj, amelyik szárazföldi, az troglobiont, amelyik pedig vízben él az stygobiont. A másik esetben a troglobiont a fő kategória, és ezen belül a stygobiont külön elnevezésnek minősül, melyet a vízben élő troglobiont fajokra alkalmazunk. Az utóbbi alkalmazást, mind rendszerezési, mind tudománytörténeti szempontból helyesebbnek tartom. Ennek megfelelően a dolgozatban a "stygobiont" kifejezést a "troglobiont" (*sensu* Sket, 2008) kategória (tulajdonképpen a rendszerezés elveitől független) szinonimájaként használom azokra a troglobiont fajokra, melyek kizárólag vízi életmódot folytatnak.

1.2. A mérsékelt égövi diverzitás

A világ különböző régióiból leírt troglobiont fajok száma erős különbségeket mutat, melynek számos oka van. Egyrészt a nagyfokú alkalmazkodáshoz idő kell, ami csak akkor áll rendelkezésre, ha az adott régióban hosszú idő óta vannak megfelelő tápanyag ellátottságú barlangi élőhelyek (Culver et al., 2006). Másrészt a barlangokban esetlegesen kialakuló mikrohabitatok száma, és így a fajok száma, pozitív összefüggést mutat a barlangok, barlangrendszerek, karsztvidékek méretével (Christman and Culver 2001, Culver et al., 2003, Culver et al. 2004).). Harmadrészt, és ez merőben technikai jellegű probléma, a kimutatott fajok száma erősen függ a kutatási aktivitástól, és a bevont szakértők számától. Az utóbbira jó példa a Baradla-Domica-barlangrendszerről megjelent legutóbbi összefoglaló (Gruber & Gaál, 2014) melyben a magyarországi szakaszcól 397, a szlovákiai szakaszcól pedig 271 faj került a fauna listára. A két fajkészlet között mindössze 12% átfedés mutatkozik. Ez nyilvánvalóan aligha magyarázható a két barlangszakasz közötti ökológiai különbségekkel. Sokkal inkább arról van szó, hogy a felmérések során eltérő csoportokra specializált szakemberek dolgoztak. Így fordulhatott elő például, hogy míg a Domicából egyetlen egy *Nematoda* sem került kimutatásra, addig a Baradlából Andrassy István évtizedekig tartó munkájának köszönhetően 31 fajt ismerünk. A fent említett tényezők nehezen vehetőek figyelembe egy átfogó elemzés során, de feltűnő, hogy a legdiverzebb troglobiont élővilággal rendelkező barlangok az északi félteke mérsékelt övében helyezkednek el (Culver & Sket, 2000). Tovább pontosítva a mintázatot, ez az észak-amerikai kontinensen az északi 33° - 35°, míg Európában az északi 42° - 46° szélességi fokok közötti sávot jelenti (Culver et al., 2006). A jelenséget a szakirodalom mérsékelt égövi biodiverzitási gerincnek nevezi (mid-latitude biodiversity ridge) (Culver & Pipan, 2009). Feltételezhető, hogy ez a sáv tovább folytatódik kelet felé Ázsián keresztül. A Nyugat-Kaukázussal kezdve, számos keveset kutatott (Gvozdetski et al., 1994, Golovats et al., 2018), ám barlangokban gazdag terület található megfelelő felszíni produktivitással (Klimchouk, 2004 a,b). Elég valószínűnek tűnik, hogy a barlangi faji diverzitásnak kedvező körülmények megfelelő együttállása áll a mintázat hátterében, ám a különböző összetevők fontosságának megállapítása komoly nehézségekbe ütközik. Annyi bizonyos, hogy jelentős szerepet

játszik a karsztterületek kora, a kiterjedt barlangrendszerek gyakorisága, a megfelelő felszíni produktivitás, és annak földtörténeti távlatú viszonylagos állandósága. Ezen tényezők szerepe Európában jobban tetten érhető, mint Amerikában. Feltűnő például a sávtól délebbre, az Ibériai félsziget száraz klímájának negatív hatása, míg a sávtól északra a pleisztocén eljegesedési határ markáns diverzitás csökkenést jelöl (Culver et al., 2009).

Érdemes megjegyezni, hogy a trópusi területek, gyakran nagy kiterjedésű karsztjain található barlangok troglobiont diverzitása a mérsékelt égövekkel összehasonlítva meglepően alacsony (Deharveng, 2005). Ez egyrészt annak tudható be, hogy a jelentős csapadékmennyiségnek, és a trópusi talajokban feldúsuló, majd a szivárgó vizekbe oldódó magas szén-dioxid koncentrációnak köszönhetően a trópusi karsztrendszerek gyorsan erodálódnak. Másrészt a barlangokba bekerülő tápanyagmennyiség, mely többnyire limitáló ökológiai tényező, a trópusi barlangokban sokszorosa a mérsékelt égövi barlangokban tapasztaltaknak, és a sok hozzáférhető tápanyag lehetővé teszi felszíni, kevésbé specializált fajok megtelepedését a barlangi környezetben. Amennyiben a diverzitásnál nem csak a troglobiont fajokat vesszük figyelembe, hanem a troglóxen, subtroglóphyle, és eutroglóphile fajokat is, akkor például a guanóban gazdag trópusi barlangok diverzitása megközelíti a mérsékelt égövi biodiverzitási gerinc barlangjainak értékét (Deharveng & Bedos, 2000). Magyarország kívül esik a jelzett sávon, ezenkívül az ország területének mindössze 1,3 %-a karsztterület. Ennek ellenére egy-két hazai barlang diverzitása magasnak mondható, mivel a pleisztocén eljegesedések kevéssé érintették a területet.

1.3. A magyarországi barlangbiológia történeti áttekintése

Magyarországon, csakúgy mint a világ többi részén, a barlangbiológia kialakulása szorosan kötődik az idegenforgalmi vonzerővel rendelkező barlangokhoz. Az első hazai barlangi élőlényről szóló híradás Vass Imrétől származik, akinek a Baradla-barlangról (ma Baradla-Domica-barlangrendszer) szóló leírásában találkozhatunk (Vass, 1831, 59. o.) az alábbi sorokkal: "Ezen a helyen találtam legelőször is élő állatokat, t.i. fejér pondrókat a puszta mészkövön lévő víz szélén mászni....." Noha a fenti leírás alapján nehéz teljes bizonyossággal megállapítani a faji besorolást, valószínűleg az aggteleki vakbolharák

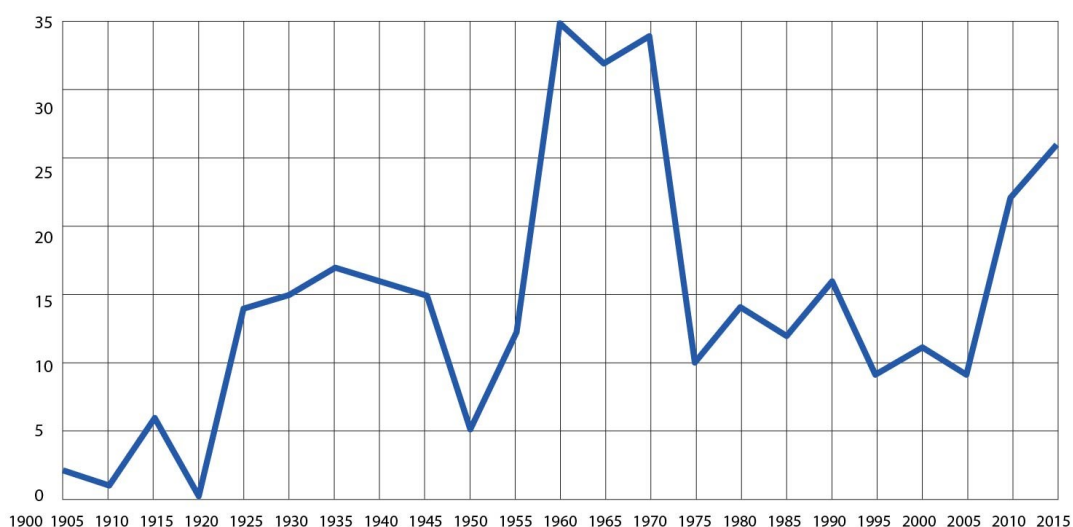
(*Niphargus aggtelekiensis* DUDICH, 1941) példányai keltették fel a neves kutató érdeklődését. A Baradla-barlang első zoológiai indíttatású bejárására 1841-ben került sor, amikor is Petényi Salamon János, és Frivaldszky Imre denevérek, és azok parazitái után kutatva bejárta a barlang akkor ismert szakaszait (Salamon et al. 2014). A legkorábbi Magyarországról leírt barlangi faj egy pióca, a "Kovács Vakóczája" (*Typhlobdella kovatsi* DIESING, 1850) volt, melyet 1846-ban gyűjtött Kovács Gyula, aki Petényi Salamon Jánost társaságában látogatott a barlangba. Sajnálatos módon ez a faj nem valid, mivel az igen elterjedt felszíni lópióca (*Haemopsis sanguisuga* LINNAEUS, 1758) junior szubjektív szinonimájának tekinthető (Košel, 1975). Nem kevésbé kalandos az első ma is valid eutroglophile faj megtalálása, és leírása sem. A sokáig troglobiontnak tekintett szárazföldi szemercsés vakáskát (*Mesoniscus graniger*, FRIVALDSZKY, 1865) először 1853-ban találta meg Frivaldszky János, aki Frivaldszky Imrével, és Bérczy Károllyal végzett gyűjtést a Baradlában. Az útról szóló beszámoló csak jóval később, egy összefoglaló munkában jelent meg (Frivaldszky, 1865). A köztes időben Adolf Schmidl végzett vizsgálatokat a barlangban, aki szintén megtalálta a fajt, és azt, az egyébként szlovéniai barlangokból ismert *Titanethes albus* (KOCH, 1841) fajként azonosította (Schmidl, 1856). Szerencsére Frivaldszky felismerte a tévedést, és a tudomány számára új fajként *Titanethes graniger* néven írta le. Bár a faj a leírás óta számos barlangi élőhelyről vált ismeretessé Magyarországról (pl. Kovács, 1953, 1954; Loksa, 1961; Bajomi, 1977a, b), és Szlovákiából (Mlejnek & Ducháč, 2003), jellemző módon elég sok időnek kellett eltelnie, mire felszíni előfordulási adat is ismertté vált (Kesselyák, 1936; Mlejnek & Ducháč, 2003).

A hazai szisztematikus barlangbiológia kezdetét talán leginkább Frivaldszky 1865-ös akadémiai értekezése jelöli. Ebben a munkában az Aggteleki-karszt, a Bihar-hegység és a Kelet-Bánság területén fekvő számos barlang élővilágát jellemezve 12 troglobiont fajt sorol fel (7 bogár (Coleoptera), 2 atka (Acari), 1 álskorpió (Pseudoscorpiones), 2 rák (Crustacea)). Az ezt követő néhány évtizedben, pár mérföldkőnek tekinthető fajleírástól (*Brachydesmus troglobius* DADAY, 1889; *Duvalius hungaricus* (mint *Anophthalmus hungaricus*) CSIKI, 1903) és Méhelý Lajos denevérekről szóló monográfiájától (Méhelý, 1900) eltekintve jelentősen visszaesett a hazai barlangbiológiai kutatás. A következő korszak kezdete az 1910-es évekre tehető, amikor Gebhardt Antal, és Bokor Elemér elkezdte a Mecsek barlangjainak faunisztikai vizsgálatát. Az első világháború okozta

törést követően, 1922-ben Dudich Endre és Bokor Elemér elhatározták, hogy megkezdik Magyarország barlangjainak szisztematikus biológiai felmérését. A kezdeményezéshez rögtön csatlakozott Gebhardt Antal és nem sokkal később a kor számos neves zoológusa (Győrfy Jenő, Kormos Tivadar, Moesz Gusztáv, Csiki Ernő, Soós Lajos). Gebhardt és Bokor ugyan több barlangban végzett kutatásokat (Bokor, 1921, 1926), de főleg az Abaligeti-barlangra és a Mánfai-kőlyukra koncentráltak erőfeszítéseik (pl. Bokor 1924, 1925; Gebhardt 1931, 1932, 1933). A legfigyelemreméltóbb eredménye ennek a munkának Gebhardt Abaligeti-barlangról szóló monográfiája (Gebhardt, 1934), melyben 264 oldalon foglalja össze a barlangbiológiai kutatásaival kapcsolatos eredményeit. Dudich ugyanebben az időszakban több állatcsoportról közölt eredményeket számos barlangból (Dudich, 1925a, b, c, 1928, 1930), majd teljes egészében a Baradla-barlang kutatására koncentrált. A Baradla-barlangról szóló „Biologie der Aggteleker Tropfsteinhöhle in Ungarn” című monográfiája (Dudich, 1932), nagyon előremutató munka több szempontból is. A több éven át tartó módszeres kutatói munka eredményeképpen, számos hazai és nemzetközi specialista bevonásával 262 beazonosított faj előfordulását ismerteti a könyvben, miközben részletesen bemutatja a barlang, mint élőhely ökológia tényezőit. Az ökológiai szemlélet, és ehhez kapcsolódóan számos környezeti változó hosszú távú megfigyelése és értelmezése ebben az időben egyedülállónak számítottak. Külön kiemelendő, hogy a monográfiában Dudich megemlíti a kemoautotrófia, mint a barlangi rendszerekben jelentős primer produkció (táplálékforrás) lehetőségét (lásd még Dudich, 1930). Ez az igen fontos gondolat sajnos egészen az 1980-as évekig nem talált visszhangra, és csak a romániai Movile-barlang élővilágának felfedezésével lett újra része a barlangbiológiának (Sarbu et al. 1996). Méhely Lajos a különnc zoológus, bár szokásához híven ebben a témában is egyedül dolgozott, szintén a 20-as években fordult a barlangbiológia felé (Méhely, 1924, 1925, 1937), számos barlangi taxon esetében megkerülhetetlen, de olykor elég hiányos publikációkat jelentetve meg (Méhely, 1927, 1941). A második világháború utáni időszakban, az 50-es évek elejétől kezdve, Dudich Endre javaslatára, a Magyar Tudományos Akadémia külön programként kezelte a barlangbiológiát, jelentős lökést adva ezzel a tudományágnak (Dudich, 1959). A programtól függetlenül, de ahhoz szorosan kapcsolódva a Baradla-barlang Róka-ágában 1958-ban létrejött egy barlangbiológiai laboratórium, mely a világon a negyedik ilyen típusú létesítmény volt.

A laboratórium kiváló körülményeket biztosított egyes érzékeny barlangi szervezetek (pl. *Mesoniscus graniger*, *Duvalius hungaricus*, *Trechus austriacus* [Gere, 1964, 1970]), és egyes talajlakó élőlények, mint például kevéssértéjű gyűrűsférgék (Zicsi, 1982, 1983), hosszú távú megfigyelésére. és lehetővé tette számos kísérlet elvégzését is (Dudich, 1960, 1965). Az itt folyó munkálatokban tucatnyi szakterület biológusa tevékenyen vett részt, jelenlétük, és bevonásuk számos fontos taxonómiai, faunisztikai felfedezést is eredményezett nemcsak az Aggteleki-karszt területén (pl. Andrassy, 1959-1985; Bajomi, 1977a, b; Berczik, 1968; Dózsa-Farkas, 1970, 1974; Kovács, 1953, 1954; Loksa, 1959-1970; Ponyi, 1956, 1958; Vágvolgyi, 1955; Varga, 1959, 1963). Ez az időszak, mely egészen a 80-as évek elejéig tartott, tekinthető a magyarországi barlangbiológia fénykorának. A legtöbb ekkor született publikáció, a szintén Dudich által életre hívott, "Biospeleologica Hungarica" sorozaban jelent meg.

Az aktivitás ezután jelentősen visszaesett, és a hazai kutatások egy-két fontos kivételtől eltekintve (pl. Dózsa-Farkas, 1990; Boldogh & Estók, 2007; Karaman, 1986; Korsós, 2000; Mahunka ed., 1993, 1996, 1999 a, b; Papp & Woźnica, 1993; Zicsi et al, 1994) minimálisnak mondhatóak (1. ábra). Ez a markáns visszaesés nem volt jellemző más országokban, sőt inkább a tudományág minden területének mai napig tartó folyamatos fellendülése volt tapasztalható (Culver & Pipan, 2009). A lemaradás behozására az elmúlt évtizedben történtek törekvések (pl. Angyal & Korsós, 2013; Ács & Kontschán, 2014; Borsodi et al., 2012; Dányi, 2011; Gruber & Gaál, 2014; Hornok et al., 2014; Novák & Kutasi, 2014; Szederjesi, 2014), de a kimaradt időszak miatt gyakran hiányoznak a megfelelő alapok, ami legalább is nehézkessé teszi a mai kor elvárásainak megfelelő kutatások elindítását és megfelelő tervezését.



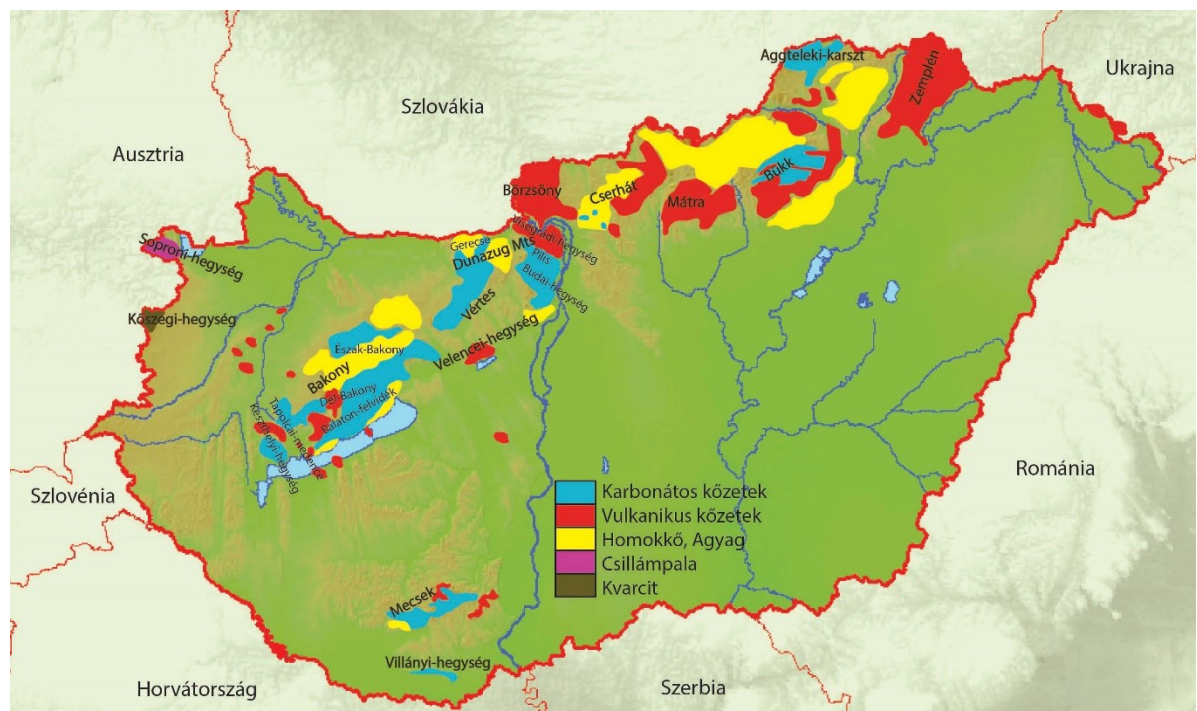
1. ábra. Magyarországi barlangbiológiai publikációk számának alakulása öt évenként összevonva 1900 és 2015 között.

1.4. Magyarországi régiók barlangi élőhelyeinek ismertetése

Magyarország 93000 km²-es területéből, csak mintegy 1350 km²-en található karsztosodó kőzet. Ennek ellenére több, mint 4000 regisztrált barlang ismert hazánkban (ide értve a nem karsztos barlangokat is). Ez a magasnak tűnő szám drasztikusan csökken, amennyiben kiterjedés szerint szűrünk. Összes barlangunk közül 1445 haladja meg a 10 méteres-, 138 a 200 méteres- és csupán 37 darab az 1000 méteres hosszúságot (forrás: Országos Barlangnyilvántartás, <http://www.termeszetvedelem.hu/index.php?pg=caves>). A magyar jogszabályok szerint barlangnak tekintünk minden a Föld szilárd kérgében, természetes úton létrejött, két méternél hosszabb, ember által járható üreget. A meghatározás országonként eltérhet ugyan, de legtöbb esetben tartalmazza az "ember által járható" kitételt, ami biológiai szempontból nehezen értelmezhető, vagy vehető figyelembe. Természetesen a barlangi élőlények számára jóval kisebb üregek, hasadékok is tökéletes barlangi életteret jelenthetnek. Ugyanakkor ez a méretbeli korlátozás, a nyilvánvaló praktikus okok miatt, sajnos legalább olyan meghatározó a biológusok számára, mint a geológusoknak. Jóllehet az utóbbi pár évtizedben komoly erőfeszítések történtek a nehezen kutatható,

kis méretű járatrendszerek, repedéshálózatok, így az epikarszt, és a talajjal kevert mállott kőzet az MSS (Millieu Souterrain Superficiel (Fr), vagy Mesovoid Shallow Substratum (En)) élővilágának mintázására (pl. Juberthie et al., 1981; Juberthie, 2000), de ennek ellenére ezen élőhelyek életközösségéről általában nagyon kevés információval rendelkezünk, a hazai vonatkozó kutatások pedig elenyészőek.

Hazánk barlangjainak jelentős többsége mészkőben alakult ki, vagy hideg-, vagy melegvizek munkájának köszönhetően, de számos nem karsztos eredetű is van közöttük (Darányi, 1972; Hevesi, 1989; Dénes, 1977; Kordos et al., 1984; Székely, 2003; Lénárt, 1981; Takácsné-Bolner et al., 1989). A különböző alapkőzetű, kialakulású, korú és morfológiájú barlangok igen eltérő életközösségeknek adhatnak otthont, ezért érdemes számba venni a hazánk tájait, és azok jellemző barlangjait ebből a szempontból (2. ábra).



2. ábra. Magyarország geológiai átnézeti térképe szubterrán élőhelyek szempontjából. A Magyar Bányászati és Földtani Szolgálat, Magyarország felszíni földtana térkép alapján (<https://map.mbfisz.gov.hu/fdt100/>).

Az Aggteleki-karszt barlangjait biológiai szempontból alapvetően három kategóriába sorolhatjuk. Az elsőbe az aktív patakos járatokkal rendelkező nagy rendszerek tartoznak. Ezeknek a barlangoknak a befolyó vizekben található szerves hordaléknak köszönhetően igen jó a tápanyag ellátottságuk. Ezen kívül a nagy méreteknek köszönhetően számos mikrohabitat található bennük. A kedvező feltételek miatt igen gazdag élővilágnak adnak otthont. A második kategóriát az Alsó-hegy zsombolyai alkotják, amelyekbe a nyílt, függőleges bejáratoknak köszönhetően viszonylag sok tápanyag jut be, jellemzően gravitációs úton, de kis mértékben az elnyelődő vizekkel is. Élőviláguk gazdag, bár elmarad a nagy rendszerekben tapasztaltaktól. A harmadik típusba a Bódva túloldalán emelkedő, már a Csereháthoz tartozó Szalonnai-hegységben található Esztramos-hegy barlangjai tartoznak. Ezek a barlangok legalább részben hidrotermális eredetűek, így elhanyagolható felszíni kapcsolatuk van, aminek köszönhetően rossz tápanyag-ellátottságúak, és faunájuk igen szegényes.

A Bükk biológiailag legérdekesebb barlangjai kétségek nélkül a nagy víznyelőrendszerek. A legtöbb ilyen barlang felépítésére jellemző, hogy a felszínről függőleges aknák, aknasorok mennek le nagyobb mélységekbe, ahol vízszintes patakos járatok kötik össze őket egészen a hegylábi forrásokig (Kordos et al., 1984). Annak ellenére, hogy a nagy mennyiségű elnyelődő víz rengeteg tápanyagot szállít a mélyebb régiókba, a Bükk barlangjainak fajgazdagsága jelentősen elmarad az Aggteleki-karszt patakos barlangjaiétól. A különbség oka talán abban keresendő, hogy a Bükk barlangjaiban elég rendszeresek a jelentős áradások, melyek során a vízszint több tíz métert is emelkedhet elérve a függőleges aknarendszereket is, míg a száraz időszakban a patakos járatok, egy-két pangó szifont leszámítva, teljesen kiszáradhatnak. Az ilyen nagy fokú vízszint-ingadozás sem a szárazföldi, sem a vízi faunának nem kedvez.

A Dunazug-hegység, melybe beletartozik a Gerecse, a Pilis és a Budai-hegység, többnyire karbonátos kőzetekből épül fel, így meglehetősen sok barlang található a területén (Székely, 2003). Ezek többnyire rossz tápanyag-ellátottságú, hidrotermális eredetű barlangok, élőviláguk meglehetősen szegényes. Az egyetlen kivételt a jelenlegi karsztvízszint alatt elhelyezkedő Molnár János-barlang jelenti, ahol hazai viszonyok között kiemelkedő diverzitású stygobiont faunával találkozunk.

A Bakony területét öt elkülönülő geológia egységre bontva (Darányi, 1966a,b) a következő megállapításokat tehetjük. A Keszthelyi-hegység, és a Tapolcai-medence

barlangjai hidrotermális eredetűek. A Tapolcai-tavasbarlang régi, de alapos felmérését leszámítva (Geyer & Mann, 1940), alig néhány szórvány faunisztikai publikáció áll rendelkezésre ezekről a barlangokról (Novák & Kutasi, 2014; Szabó, et al., 2013), de az irodalmi adatok, és a bejárások alapján alacsony diverzitás jellemzi őket. A Balaton-felvidéken kis méretű, többnyire erősen erodált reliktum barlangok találhatóak, melyek értelemszerűen kevés élőlénynek adnak otthont. A Dél-Bakony mészkőtömbjét részben bazalt fedi, ezért barlangok kialakulása, leszámítva a Kab-hegy oldalát, nem jellemző. Az Észak-Bakony jelentős barlangjainak nagy része a Tési-fennsíkot alkotó Triász kori mészkőben található. A hidegvizes eredetű barlangok élővilágáról kevés adat áll rendelkezésre, de az eddigi felmérések alapján az ezekben előforduló fajok száma messze elmarad az Északi- Középhegység barlangjaiban fellelhetőektől. Ennek részben az lehet a magyarázata, hogy az Észak-Bakony területének egy jó részét Oligocén, és Miocén üledék takarja, mely hátráltatja a karsztosodást, így igazán nagy rendszerek nem alakulhattak ki.

A Dél-Dunántúlon találhatóak a Mecsek, és a Villányi-hegység mészkőtömbjei. Az izoláltan elhelyezkedő Villányi-hegységben hidrotermális eredetű barlangok vannak, melyek többnyire a bányászat következtében váltak ismertté (Székely, 2003). A hegység barlangjai a gazdag formakincsük miatt intenzíven kutattak, míg feltehetőleg nem túl gazdag élővilágukról szinte semmit nem tudunk. A Mecsek, viszonylag kis területe ellenére számos barlangot rejt magában. A barlangképződés leginkább a Nyugat-Mecsek területére összpontosul. A több, mint 200 ismert barlang többségének kiterjedése nem túl nagy, csupán 28 haladja meg az 50 méteres járható hosszúságot (forrás: Országos Barlangnyilvántartás, <http://www.termeszetvedelem.hu/index.php?pg=caves>). Régóta, ám lassan fejlődő karsztvidék, és bár a járatok mérete közel sem impozáns, a földtörténeti léptékben is hosszan fennálló stabil környezetnek köszönhetően sok troglobiont faj ismert innen, melyek közül többre jellemző az endemizmusok magas aránya.

Hazánkból közel 500 nem karsztos eredetű barlang ismert, melyek alapkőzete (bazalt, andezit, riolit stb.), és kialakulásuk módja (tektonikus, abrázios, explóziós stb.) igen változatos (Székely, 2003). Közös jellemzőjük az, hogy általában kis kiterjedésűek, többnyire alig pár méter hosszúságot érnek el. A leghosszabb hazai pszeudokarszt barlang a Mátrában található riodácittufában keletkezett Csörgő-lyuk a maga 428

méteres járathosszával. A nem karsztos barlangjaink élővilága igen szegényes, de egy-két taxon elterjedési mintázatának megértéséhez nagyban hozzájárulhatnak az ezekből származó faunisztikai ismeretek. Ebből a szempontból nem elhanyagolható a nem üledékes kőzetekből álló hegységeinkben kialakult repedéshálózatok vizsgálata sem, bár ez rendre komoly technikai akadályokba ütközik, és többnyire csak akkor lehetséges, ha valamely más célú emberi beavatkozás kapcsán mintázhatóvá válik az élőhely.

Összegzőképpen elmondható, hogy Magyarország földrajzi adottságainak megfelelően barlangbiológiai szempontból nem tekinthető kiemelkedő területnek. Ez alól kivételt képeznek az Aggteleki-karszt, és a Mecsek barlangjai, mivel ezeken a területeken, ugyan eltérő módon kialakult, de magas diverzitású barlangi életközösségeket találhatunk. Természetesnek vehető, hogy a magyarországi barlangbiológiai kutatások a kezdetektől fogva ezekre a helyekre összpontosultak. A nagyméretű, és nyilvánvaló bejáratú barlangok idegenforgalmi, geológiai, paleontológiai, archeológiai és biológiai érdeklődést is kiváltanak. Azonban nem csak erről van szó. Ezek a sokszor impozáns járatrendszerek méretüknél fogva jó terepei a sokféle mikrohabitat kialakulásának, mely az egyik egyértelmű alapfeltétele a magas diverzitásnak. A kutatók, legyen szó bármilyen tudományág művelőiről, érthető módon előnyben részesítik azokat a területeket, ahol jó eséllyel tehetnek új felfedezéseket. Dacára a viszonylag kevés hazánkban előforduló barlangi fajnak, Magyarország jó kutatási területnek számít. Ez elsősorban annak köszönhető, hogy szemben a nagy kiterjedésű, olykor országokon átívelő egybefüggő karsztterületekkel, nálunk egymástól különböző mértékben izolált szubterrán élőhelyekben gazdag területek vannak, így adott esetben tisztább képet nyerhetünk általános folyamatokról, mint ott ahol a jelenben tapasztalható mintázatok megértését sokszor kibogozhatatlan földtörténeti háttér nehezíti.

1.5. Barlangi adaptáció, troglomorfózis és kolonizációs elméletek

Mint minden tudományterületen a barlangbiológiában is fontos törekvés az általános érvényű szabályszerűségek megállapítása. Az egyik legkorábbi ilyen próbálkozás arra a megfigyelésre alapul, hogy a valódi barlangi élőlények többségére nagyon hasonló morfológiai karakterek jellemzők. Ezt a jelenséget troglomorfózisnak nevezzük

(Christiansen, 1962). A kifejezés eredetileg csak a morfológiai változásokra vonatkozott, sok szerző azonban, kissé megtévesztő módon, ide sorolja az élettani és viselkedési változásokat is. A tipikus morfológiai változásokat két kategóriába sorolhatjuk a szerint, hogy regresszióról, vagy progresszióról van szó (Culver & Pipan, 2009; Romero, 2009). Az elsőbe a teljesség igénye nélkül a szemek elcsökevényesedése, az idegrendszer látásért felelős régiójának visszafejlődése, a pigmentáció hiánya, és a kutikula elvékonyodása tartozik. A másodikba a vizuális érzékelés hiányát pótló érzékszervek fejlődésének megnyilvánulásai szerepelnek, úgy mint a mechano-, és kemoreceptorok, és az ezekhez kapcsolódó idegrendszeri képletek megnagyobbodása, valamint a végtagok, és csápok megnyúlása. Az élettani alkalmazkodások közé tartozik a lassú metabolizmus, a cirkadián ritmus eltűnése, a csökkent szaporodási ráta, a megnövekedett élethossz, és a fejlett tápanyag-raktározás (Romero, 2009). A viselkedési változások tekintetében nagyon nehéz általános kijelentéseket tenni, hiszen ez erősen taxon és helyzetfüggő. A troglomorfózis kifejezés használata általánosan elterjedt, és bár sok esetben elég egyértelmű mintázatról van szó, használatát, és az ahhoz kapcsolódó elméleti háttérrel több probléma is árnyalja. Az egyik ilyen (jelen esetben inkább történeti jelentőségű) probléma az, hogy pusztán praktikus okokból bizonyos klasszifikációs rendszerekben a valódi barlanglakó kategóriába történő besorolás feltétele a troglomorfózis (lásd korábban). A valóságban azonban nem minden valódi barlanglakó mutatja a troglomorfózis jegyeit, vagy nem azonos mértékben (Romero & Green, 2005), hiszen ezek kialakulásának vannak feltételei, és a változások kifejlődéséhez adott esetben hosszú idő szükséges. A tipikus troglomorf jegyek ráadásul nem minden taxonnál jelentkeznek, vagy jelentkezhetnek. Például egy szűk repedésekben élő felemáslábú ráknak (Amphipoda), ugyan hiányozhat a szeme, és lehet depigmentált is, de a végtagok, és a csápok megnyúlását nem fogjuk tapasztalni, hiszen ezek akadályoznák a mozgásban (Delić et al., 2016; Zakšek et al., 2019). Nehézséget okozhat az is, hogy bizonyos taxonoknál például a szemek hiánya, és a gyenge pigmentáció egyértelmű változást jelent, míg más esetekben ezek a tulajdonságok nem csak a barlangi fajokra vonatkoznak hanem a taxon felszíni fajaira is jellemzőek. A fenotípusos plaszticitás (egy genotípus képessége különböző fenotípus létrehozására eltérő környezetekben, (West-Eberhardt, 2003)) szerepét sem zárhatjuk ki az aktuálisan megfigyelt troglomorfoknak tartott tulajdonságnál, különösen a barlangi élőhelyet frissen

kolonizált fajok esetében. Mivel többnyire sem a genotípus-fenotípus viszonyáról, sem a kolonizáció időpontjáról nincs információnk, pusztán a troglomorf tulajdonságok megléte, vagy hiánya alapján következtetéseket levonni gyakran nem lehet.

Az élővilágban számos esetben találkozunk regresszív evolúcióval, de tekintve, hogy a barlangi fajoknál ez igen gyakori jelenség, ezért régóta központi kérdése a tudományterületnek. Amennyiben nem számítjuk bele a klasszikus Lamarckiánus magyarázatot (nem ide értve az epigenetikát), az eddigi kutatások alapján két elterjedt irányvonal van jelen. A nem szelekcionista irány főként Észak-Amerikából indult, és az egyik korai magyarázata szerint a barlangi állatok nem azért vakok, és depigmentáltak, mert sötétben élnek, hanem azért élnek barlangokban, mert vakok, és depigmentáltak (Banta, 1907). Jóval megalapozottabb elképzelést képviselt Kosswig, aki közönséges víziáskák (*Asellus aquaticus* LINNAEUS, 1758) szlovéniai barlangi populációit vizsgálva, arra a következtetésre jutott, hogy mivel a populációk nagyfokú polimorfizmust mutatnak, a magyarázat olyan mutációk felhalmozódásában keresendő, melyek nincsenek szelekciós nyomás alatt (Kosswig, 1965). A neutrális mutációk felhalmozódásának elmélete további megerősítést nyert a barlangi vaklazac (*Astyanax mexicanus* DE FILIPPI, 1853) szemének degradációjával kapcsolatban végzett korai vizsgálatok által (Wilkens, 1971, 1988). A szelekcionista irányvonal alapvetően Európából indult (Racoviță, 1907), de sokáig egészen elméleti elképzelés maradt. Az első igazi elmozdulást az alátámasztás felé a konvergens evolúció jelenlétének bizonyítása jelentette. Christiansen több, különböző fejlődési ágból származó barlangi ugróvillás fajnál is ugyanazokat a morfológiai adaptációkat mutatta ki (Christiansen, 1961, 1965). A legtöbbet kutatott barlangi faj, a barlangi vaklazac. Az *Astyanax mexicanus* különböző populációin végzett modern genetika vizsgálatok eleinte a neutrális mutáció elméletét támasztották alá (Jeffery & Martasian, 1998) a szem fejlődéséért felelős egyik gén hibáját kimutatva. Később azonban sikerült azonosítani olyan géneket is, amelyek fokozott expressziója elősegíti a szem degradációját (Yamamoto et al., 2004; Jeffery, 2005a), ilyenformán ez a változás nem magyarázható neutrális mutációval. Logikus szelekcionista magyarázat a regresszív változásokra, hogy adott esetben nagy energiabefektetést igényel a feleslegessé vált tulajdonságok kifejlődése, tehát előnybe kerül az az egyed, amelyik nem fordít energiát a nem hasznos tulajdonságok létrehozására az egyedfejlődése során. Az, hogy ez az előny milyen mértékű, és

mennyiben segíti a troglomorfizmus kialakulását nehezen vizsgálható téma. Ezzel kapcsolatban érdemes megjegyezni, hogy például a szemlencse apoptózisa során először fokozott sejtosztódás figyelhető meg, amely önmagában ellentmond az energetikai hipotézisnek (Jeffery, 2005b). Nem árt azonban figyelembe venni, hogy ez csak az egyik lépése egy összetett folyamatnak, melynek messze nem ismert minden részlete. Jóllehet a neutrális mutáció felhalmozódás szerepének fontossága továbbra is vitatott, a modern barlangbiológiában egyértelműen előtérbe került a szelekcionista értelmezés.

Barlangok faunáját elemezve érdekes kérdés, hogy mi határozza meg a vizsgált terület fajösszetételét. A barlangok többsége a repedéshálózatoknak, és a bejáratoknak köszönhetően folyamatos összeköttetésben van a felszíni környezettel, és annak fajkészletével. Elvileg tehát bármely közeli felszíni faj megtelepedhet a hypogean (felszín alatti) élőhelyeken, és kialakulhat belőle barlangi faj. A valóságban azonban ez még sincs így, mivel egyrészt nem minden élőlény alkalmas a szubterrán életre, másrészt a felszínnel meglévő folyamatos kapcsolat lehetővé teszi a génáramlást, ami lassítja a fajképződést. A barlangi élőhelyek kolonizációjának folyamatát alapvetően négy kérdés irányából közelíthetjük meg (Culver & Pipan, 2009). Mi miatt kerül az élőlény a barlangba? Mi teszi lehetővé a túlélését és szaporodását az új környezetben? Mi okozza a felszíni populációtól való elkülönülést? Milyen mértékű felszín alatti diszperzió képzelhető el? A felsorolt kérdésekre adott lehetséges válaszok nem feltétlenül választhatóak el egymástól. A két legnépszerűbb feltételezés, a klimatikus reliktum hipotézis (CRH), és az adaptív shift hipotézis (ASH) igazolására egyaránt számos példa áll rendelkezésre.

A CRH estében abból a feltételezésből indulunk ki, hogy a földtörténet során létrejött klimatikus változások átmenetileg, vagy tartósan kedvezőtlen felszíni környezetet jelenthetnek fajoknak, amelyek a barlangok kedvezőbb körülményei között túlélhetnek az adott területen (Danielopol & Rouch, 2005; Peck & Finston, 1993), míg a felszíni populációk átmenetileg eltűnnek, vagy kihalnak. Ez technikailag végső soron allopatrikus fajkeletkezésnek fogható fel. Az elmélet igazolására jó példák azok az esetek, melyekben barlangi adaptációt mutató fajok jelenléte, és elterjedési mintázata magyarázható klimatikus viszonyok változásával. Észak-amerikai (Peck, 1984), és európai (Polak et al., 2016) barlangi bogárfajok esetében egyaránt sikerült bizonyítani a negyedidőszaki

eljegesedések szerepét, míg ausztráliai vízi bogarak barlangi kolonizációjában igazoltan szerepet játszottak a száraz klímájú földtörténeti időszakok (Cooper et al., 2002, Leys et al., 2003). Érdekes esetek, és bizonyos szempontból ide sorolhatóak azok a stygobiont fajok, melyek tengeri ősökkel rendelkeznek, de mostanra édesvízi barlangokban fordulnak elő. Erre a jelentősnek tetsző váltásra több példát is találunk elsősorban a mediterránemuban (pl. *Congerius kusceri* (Bivalvia), *Troglocharis* fajok (Malacostraca), *Marifugia cavatica* (Polychaeta)). Logikusnak tetsző magyarázat a jelenségre, hogy a Földközi-tenger medencéje a geológiai korokban többször kiszáradt, és a szubterrán vizek lehetséges élőhelyet biztosítottak azon fajok számára, amelyek képesek voltak alkalmazkodni ehhez a környezethez (Hou et al., 2011).

Az ASH inkább parapatikus fajkeletkezést feltételez, melyben egy felszíni populáció bizonyos egyedei barlangi élőhelyre váltanak egy új élőhely, vagy táplálékforrás kihasználásának érdekében. Az elmélet igazolása legtisztább formában a Hawaii-szigetek vulkánikus eredetű lávacsatornáiban élő barlangi fajoknál figyelhető meg (Howarth, 1980, 1987). Ebben az esetben a felszíni környezet száraz, meleg és szegény táplálékban, míg a barlangi környezet enyhébb klímájú, és a hozzáférhető tápanyag mennyisége is több. Leegyszerűsítve, és kicsit más nézőpontból közelítve azt mondhatjuk, hogy a CRH esetében hangsúlyosabb a felszíni környezet kedvezőtlenége, míg az ASH esetében jelentősebb szerepet kap a szubterrán élőhelyben rejlő lehetőség.

A troglobiont és stygobiont fajokra nagyfokú endemizmus jellemző (pl. Christman et al., 2005), különösen, ha figyelembe vesszük a kriptikus fajok jelenlétét is (Trontelj et al., 2009). Ez olyannyira jellemző, hogy bizonyos taxonok esetében, a csak egyetlen barlangból ismert fajok száma, a taxon az összes ismert fajának több, mint 40%-át teszi ki (Culver & Pipan, 2009). A gyakori, és szélsőséges endemizmus miatt sokáig tartotta magát az a nézet, hogy a valódi barlangi fajok esetében, mivel lehetséges élőhelyeik között komoly barrierként jelentkező felszíni környezet van és a földalatti diszperzió lehetősége elhanyagolható, többnyire vikariáns fajképződés a jellemző. Kivételt képeznek ez alól azok a földrajzi helyek, ahol a barlangi élőhelyek nagy denzitásban fordulnak elő, mint például Szlovénia egyes vidékein. Az utóbbi évtizedekben ez a szigorú nézet árnyaltabb képet mutat. A megváltozott megítélés oka abban keresendő, hogy a nem klasszikus barlangi élőhelyek (epikarszt, MSS, intersticiális) fontosságának felismerésével jobban elképzelhetővé vált a diszperzió lehetősége. Mindennek ellenére

nagyon kevés olyan troglobiont vagy stygobiont fajt ismerünk, melynek az elterjedési területe meghaladja a 200 km-es lineáris kiterjedést (Culver & Pipan, 2009), ami mindenképp azt mutatja, hogy a diszperzió lehetősége korlátozott. Sajnálatos módon a vikariáns, és diszperziós kolonizáció elkülönítése aktuális felszíni populációk hiányában lehetetlen, hiszen a tapasztalt jelenlegi mintázat mindkét esetben ugyan az lesz (Culver et al., 2009).

A két meghatározó kolonizációs elmélet mellett vannak egyéb felmerülő lehetőségek. A barlangokban a kevés tápanyagnak köszönhetően kevés trofikus szint alakul ki. Számos olyan barlangi életközösséget ismerünk, melyben nincsenek ragadozók. Feltételezhető tehát, hogy a ragadozó elkerülésnek, mint mozgatórugónak bizonyos esetekben szerepe lehet a kolonizációban (Romero, 2009). Az irodalmi adatok alapján ezt a jelenséget bizonyító erejűen mindössze egyszer, a barlangi vaklazac (*A. mexicanus*) esetében sikerült kimutatni (Romero, 1985). A barlangokban fellelhető limitált táplálékforrások ellenére elképzelhető, hogy mivel kevés tagja van az életközösségnek, ezért az interspecifikus versengés csökkent mértékben van jelen azon élőlények előnyére, melyek jól tudnak alkalmazkodni a körülményekhez.

A felsorolt kolonizációs elméletek nem zárják ki egymást. Feltételezhetően a legtöbb esetben több tényező befolyásolja a kolonizáció folyamatát, de akadnak olyan példák is, melyeknél egy-egy tényező szerepe kimutathatóan hangsúlyos. A kolonizáció sikerében minden bizonnyal szerepet játszanak az adott faj tulajdonságai. A tipikus barlangi környezetben azok az élőlények élnek jó eséllyel túl, és képesek tartósan megtelepedni, amelyek nem támaszkodnak nagy mértékben a vizuális érzékelésre, esetleg fejlett nem vizuális érzékeléssel rendelkeznek, jól viselik a kevés táplálékot, a magas páratartalmat, a viszonylag alacsony hőmérsékletet és élettanilag és életmenetük tekintetében nem elengedhetetlenül kötődnek a felszíni élőhely valamely forrásához. Régebben ezeket a megtelepedést segítő tulajdonságok összességét gyakran nevezték preadaptációnak. Az utóbbi években azonban inkább a helyesebb exaptáció kifejezés terjedt el, mivel annak a preadaptációval ellentétben nincsen irányultsága, és nem utal teleologikus gondolkodásra. Az exaptáció szerepe egy sikeres kolonizációban részleteiben nehezen érhető tetten. Mivel általánosságban írja körül a barlangi életmódra való áttérést segítő tulajdonságokat, az egyes tulajdonságok fontosságának értékelése az adott folyamatban többnyire nem lehetséges. Az azonban tagadhatatlan, hogy az exaptáció többnyire

komoly szerepet játszhat, mivel a legtöbb troglobiont élőlény őse olyan faj, mely a barlangi környezethez bizonyos szempontból hasonló környezetben él.

1.6. A hazai stygobiont fajok áttekintése

A hazai stygobiont fajok között legnagyobb számban a vakbolharások (*Niphargus*) fordulnak elő, így ez az a taxon az, amely leginkább alkalmas általánosabb barlangbiológiai kérdések vizsgálatára. A magyarországi *Niphargus* fajok helyzetének tisztázása elengedhetetlen része minden további kutatásnak, ezért az külön hangsúlyos része az értekezésnek. Mindemellett, véleményem szerint a többi hazai stygobiont fajra vonatkozó ismereteink rövid összefoglalása sem felesleges, hiszen sok kiegészítő információval szolgál a tudományterületben rejlő lehetőségekről, a nyilvánvaló hiányosságokról és rávilágít a vitatott helyzetek természetére. Az felsorolásból egyértelműen kiderül, hogy a hazai stygobiont taxonok száma koránt sem egyértelmű, még úgy sem, hogy az alábbi részből tudatosan hagytam ki az egysejtűeket, abban a hitben, hogy ezek klasszifikációja stygobiont-eutroglophile szempontból szinte mindig kérdéses.

A hazánkból kimutatott kerekessérgek (Rotatoria) közül két fajt tekintünk stygobiontnak. A *Proales baradlana* VARGA, 1959 a Baradla barlangból került leírásra, és más élőhelye nem ismert. A *Habrotrocha baradlana* VARGA, 1963 fajnak szintén a Baradla-barlang a típuselőhelye, de kissé meglepő módon a földrajzilag igen távol eső Romániai Movile-barlangból is van előfordulási adata (Sarbu & Popa, 1993).

Az örvényférgek (Turbellaria) közül szintén két stygobiont fajt eleme a hazai faunának. Mindkettő a Mecsekben található Mánfai-kőlyukból került leírásra. A kissé bizonytalan taxonómiai helyzetű *Polycelis tothi* MÉHELY, 1927 nagyon hasonlít az igen elterjedt *Polycelis felina* DALYELL, 1814 fajra. Méhely a leírásában említi ezt a hasonlóságot, és mivel nem volt lehetősége teljesen kifejlett genitáliákkal rendelkező példányokat vizsgálni, további példányok gyűjtését és vizsgálatát javasolja a kétségek eloszlatása végett. Mivel ez nem történt meg, a faj elfogadottsága nem teljesen egyöntetű (pl. Kenk, 1974). Elképzelhető, hogy az Abaligeti-barlangból korábban Dudich (1925a), és Méhely (1925) által is említett *Polycelis cornuta* (JOHNSTON, 1822) is valójában *P. tothi*, vagy *P. felina*. A *Dendrocoelum pannonicum* MÉHELY, 1927 a Mánfai-kőlyuk

endemikus faja. Sajnálatos módon, mivel az utóbbi években a típuslelőhely rendszeres bejárása során nem sikerült példányok nyomára bukkanni (Angyal & Balázs, 2013a), elképzelhető, hogy ez a faj a barlang mesterséges átalakítása miatt kipusztult (Angyal, 2012).

A stygobiont soksertéjűek (Polychaeta) közül hazánkban egyedül az Európában sokfelé megtalálható *Troglochaetus beranecki* DELACHAUX, 1929 előfordulására van adatunk a Béke-barlangból (Andrássy, 1956).

Barlangokban, és ez alól nem kivételek a hazai barlangok sem, viszonylag gyakran találkozhatunk kevésertéjű gyűrűsférgekkel (Oligochaeta). Ezek azonban többnyire trogloxen, vagy eutroglophile fajok. Az egyetlen stygobiont hazai faj a *Helodrilus mozsaryorum* (Zicsi, 1974) (eredetileg mint *Allolobophora mozsaryorum*). A faj egyedül a Baradla-Domica-barlangrendszerhez tartozó Baradla Rövid-Alsó-barlang vízzel telt szifonjaiban fordul elő.

Hazai barlangokból eddig két stygobiont csiga fajt jeleztek, és írtak le. A *Paladilhiopsis hungarica* (Soós, 1927) (= *Bythiospeum hungaricum* = *Lartetia hungarica*) és a *Paladilhiopsis cf. gebhardti* (WAGNER, 1931) (= *Bythiospeum gebhardti*) egyaránt a Mecsek barlangjaiban fordul elő. A *P. hungarica* az Abaligeti-barlang lakója, míg a *P. gebhardti* a Mánfai-kőlyukban fordul elő. Wagner (1942) említi a *P. gebhardti* előfordulását több felszíni forrásból is, de arra nem tér ki, hogy ezek az észlelések üres héjakra, vagy élő egyedekre vonatkoznak. A két faj morfológiailag igen hasonló egymáshoz, ezért külön fajként kezelésük régóta vita tárgya (Wagner, 1931; Pintér, 1968). A legutóbbi genetikai, és morfológiai vizsgálataink szerint (Angyal et al, 2018) a két élőhelyen előforduló egyedek valamelyest különböznek egymástól. Az elkülönülés mértékét nehéz megbecsülni, különösen, hogy míg a vizsgálat az Abaligeti-barlangban csak "abaligeti" haplotípusokat talált, addig a Mánfai-kőlyukban a "mánfai" haplotípusok mellett "abaligeti" haplotípusok is előfordultak. Sajnálatos módon a vizsgálat csak mitokondriális géneket (COI, 16S) vett figyelembe, így az esetleges hibridizáció nem jelenik meg az eredményekben (Angyal et al., 2018). A Truncatelloidea szupercsaládba tartozó fajok rendszertani besorolása a jól használható morfológiai bélyegek hiánya miatt, igen nehéz. A két mecseki fajt sokáig a Hidrobiidae család főképp alpesi elterjedésű *Bythiospeum* nemébe sorolták. A legújabb genetikai vizsgálat szerint

(Hofman et al., 2018; Falniowski, 2019) azonban egyértelműen a Moitessieriidae család *Paladilhiopsis* nemébe tartoznak.

Az evezőlábú rákok (Copepoda) közül hazánkból négy stygobiont taxont ismerünk, melyek közül három a típuslelőhelyére nézve endemikus. Az *Elaphoidella pseudojeanneli* PONYI, 1956 a Béke-barlangból, míg az *Elaphoidella pseudojeanneli aggtelekiensis* PONYI, 1958 a Baradla-barlangból került leírásra. Petkovski szerint mindkét taxon státusza megkérdőjelezhető, mivel feltehetőleg az *Elaphoidella phreatica* (CHAPPUIS, 1925) fajjal azonosak (Petkovski, 1972). A *Ceuthonectes hungaricus* PONYI, 1958 fajnak szintén a Baradla-barlang a típuslelőhelye, és egyben ez az egyetlen ismert előfordulási helye. A széles elterjedésű stygobiont *Elaphoidella elaphoides* (CHAPPUIS, 1923) a Meteor-barlangból lett kimutatva (Bajomi, 1969a, b).

A kagylósrákok (Ostracoda) közül egyetlen biztosan stygobiont taxon van Magyarországon. A *Potamocypris fulva aggteleki* MEISCH, 2000 csak a Baradla-barlangból ismert (Meisch, 2000). Érdemes megemlíteni a Baradla-barlangban, és a környező forrásokban élő *Cryptocandona dudichi* (KLIE, 1930) (eredetileg *Candona dudichi*, KLIE 1930) helyzetét. A barlangi, és felszíni populációk között tapasztalható morfológiai eltérés (Namiotko et al., 2001), de az elkülönülés mértéke további morfológiai, és genetikai vizsgálatok nélkül nem tisztázható (Gidó, 2007). Így jelenleg eutroglophile fajnak tekintjük.

A maradványrákok (Syncarida) három hazai stygobiont taxonja közül kettő esetében kétséges a taxonómiai helyzet. A Béke-barlangból leírt *Bathynella hungarica* PONYI, 1957, és a Baradla-barlangból leírt *B. hungarica baradlana* PONYI, 1957 egyaránt szinonimizálásra került Noodt (1967) által, mint *Bathynella natans* VEJDOVSKÝ, 1882. Későbbiekben Camacho (2006) összefoglaló munkájában inkább alfaji besorolást javasolt *Bathynella natans baradlana* PONYI 1957, és *Bathynella natans hungarica* PONYI, 1957 neveken. A stygobiont *Bathynella natans* VEJDOVSKÝ, 1882 szintén ismert az Abaligeti-barlang patakjának üledékéből (Farkas, 1957).

A hazai ászkarákok (Isopoda) közül két taxont tekintünk stygobiontnak. Mindkettő a Mecsek barlangjaiban fordul elő. A *Protelsonia hungarica* MÉHELÝ, 1924 az Abaligeti-barlang főágából került leírásra. Három évvel a faj leírása után Mánfai-kőlyukból gyűjtött egyedek alapján Méhelý (1927) új alfajt írt le *Protelsonia hungarica robusta* MÉHELÝ, 1927 néven. Az elkülönítés alapjául két eltérő morfológiai karaktert használt, később

ezeket Angyal (2015) további karakterekkel bővítette. Gebhardt (1963) további két, az Abaligeti-barlanggal nem közvetlen kapcsolatban lévő helyről jelezte a *Protelsonia hungarica* előfordulását, ezek a "Kisaplika" (a szövegből nem derül ki, hogy a barlangra, vagy az azonos nevű forrásra utal), és a Melegmányi-forrásbarlang. A *Protelsonia hungarica* fajt az Abaligeti-barlang főágán kívül a Nyugati 2-es mellékágából, és az Abaligeti-barlanggal bizonyított vízrajzi kapcsolatban lévő Vadetető-s-barlangból is sikerült kimutatnunk (Angyal & Balázs, 2013). A taxon újraleírását Maginez (2000) publikálta *P. hungarica hungarica* MÉHELY, 1924 nominális alfajként.

2. Célkritizálás

Biológiai szempontból a barlangok mint élőhelyek, és a bennük előforduló élőlények egyaránt jó lehetőséget kínálnak nem csak célzott taxonómiai és ökológiai kutatások lefolytatására, de általános kérdések vizsgálatára is. A barlangi élőhelyek izoláltsága és a különleges életkörülményekhez való alkalmazkodás elősegíti a fajképződést (Culver & Pipan, 2009). Mivel egy földrajzi területen belül a barlangi élőhelyek sokszor igen hasonló életfeltételeket kínálnak, ezért olyan replikátumokat jelentenek, melyekben hasonló evolúciós folyamatok zajlanak le egymástól függetlenül. A barlangokban lezajló kolonizációs és adaptációs folyamatok megértéséhez olyan modell rendszerek, és modell fajok vizsgálata szükséges, melyek valamilyen léptékben szemlélve replikátumként jelennek meg. A megfelelő taxonokat tehát a troglobiont és eutroglophile élőlények között kell keresnünk, olyan taxonokat kijelölve, melyek vagy számos fajjal rendelkeznek, vagy rendszeresen kolonizálnak szubterrán élőhelyeket. A mérsékelt égövi epigén (felszíni vizek hatására) kialakulású karsztrendszerek esetében a legfőbb szubterrán táplálékforrást a felszínről befolyó vizek által szállított tápanyagok jelentik (Romero, 2009). Nem meglepő tehát, hogy a barlangi élőlények esetében a legnagyobb faji diverzitást a vízben élő barlanglakók képviselik. A magyarországi barlangok száma nem túl magas, és faunájuk közepes diverzitású. Ez egyrészt korlátozza az általános kérdések vizsgálhatóságát, másrészt megfelelő körültekintéssel, a limitációkat figyelembe véve kiválasztott kérdések esetében előnnyel is járhat a vizsgált rendszerek egyszerűségének köszönhetően. A hazai barlangi taxonok

közül a *Niphargus* genusz megfelelő fajszámmal képviselteti magát az általánosabb kérdések vizsgálatához. A hazai barlangbiológiai kutatások egykor a világ élvonalába tartoztak, de az elmúlt pár évtizedben a tudományág Magyarországon jelentősen visszaszorult, miközben a világ több országában jelentős fejlődésen ment keresztül. Mivel Magyarország biogeográfiai szempontból fontos földrajzi helyen van, az innen származó vizsgálati eredmények komoly nemzetközi érdeklődésre tartanak számot.

A dolgozatomban ismertetett vizsgálatok közül az első, mely a hazai említésű *Niphargus* fajok taxonómiai helyzetének tisztázására irányult, gyakorlatilag egy kényszerű hiánypótlás, mellyel biztos alapokat kívántam teremteni a további vizsgálatokhoz, és reményeim szerint az ismeretanyag bővítése segítséget nyújt más kutatók számára is a témában rejlő lehetőségek kiaknázására.

A második vizsgálat a hazai *Niphargus* fajok rokonsági viszonyainak feltárását célozta meg. Ez esetben arra voltam kíváncsi, hogy Magyarország különböző tájegységeinek *Niphargus* fajai, milyen rokonsági viszonyban állnak egymással, és más európai fajokkal. Továbbá képet szerettem volna kapni arról, hogy a különböző hazai szubterrán élőhelyek *Niphargus* fajai milyen földrajzi régiókhoz köthető nagyobb kládok képviselői, mely információ hozzájárulhat a főbb kolonizációs irányok megismeréséhez.

A harmadik vizsgálatcsoport tulajdonképpen egy esettanulmányként értelmezhető. A különleges feltételeket biztosító Molnár János-barlang stygobiont faunája, a benne előforduló öt makroszkopikus gerinctelen fajjal, melyből három a *Niphargus* nembe tartozik, hazai viszonylatban kiemelkedően gazdag. Ez a fajszám a későbbiekben lehetővé teheti különböző ökológiai interakciók vizsgálatát, miközben kellően leegyszerűsített rendszert alkot. A barlang faunisztikai felmérése, és a benne előforduló fajok eredetének megértése alapvető fontosságú a további vizsgálatokhoz. A barlangban két olyan faj is előfordul (*Niphargus hrabei* S. KARAMAN, 1932, *Asellus aquaticus*), mely eutroglophile populációkkal képviselteti magát. A helyszín morfológiai felépítése a barlanghoz kapcsolódó Malom-tóval, és a közeli Dunával, melyek közül mindegyikben megtalálható a két faj stabil populációja nagyon jó feltételeket kínál kolonizációs, adaptációs és speciációs folyamatok vizsgálatához. A két faj jelentősen eltérő exaptációt mutat, ami alapján várható volt, hogy az azonos környezeti feltételek ellenére legalább részben más folyamatok határozták meg a barlangi populációk kialakulását.

A disszertációmban tárgyalt főbb kérdéseim az alábbiak voltak:

1. Hány valid *Niphargus* fajt ismerünk a hazai faunában, és melyek ezek? Milyen új, vagy ismert, de a hazai faunából eddig ki nem mutatott faj fordulhat még elő?
2. Milyenek a hazai *Niphargus* fajok rokonsági viszonyai? Milyen feltételezéseket tehetünk a rokonsági viszonyokból az egyes élőhelyek fajainak földrajzi eredetéről, és a különböző élőhelyek faunakészletének kialakulásáról?
3. Milyen makroszkopikus gerinctelenek fordulnak elő a Molnár János-barlangban, és azoknak mi lehet az eredete? Milyen különbségek és hasonlóságok fedezhetők fel a Molnár János-barlangban, a vele hidrológiai kapcsolatban lévő Malom-tóban és a szintén hidrológiai kapcsolatban lévő Dunában élő *N. hrabei* és *A. aquaticus* populációk genetikai szerkezetében? Milyen izolációs mechanizmusok rajzolódnak ki a különböző mértékű exaptációt mutató fajoknál? Milyen fototranszdukciós kaszkád elemeit érintő genetikai változások játszhatnak szerepet a látás képességének elveszésében a *N. hrabei* és az *A. aquaticus* fajoknál?

3. A hazai *Niphargus* fajok taxonómiai helyzetének vizsgálata

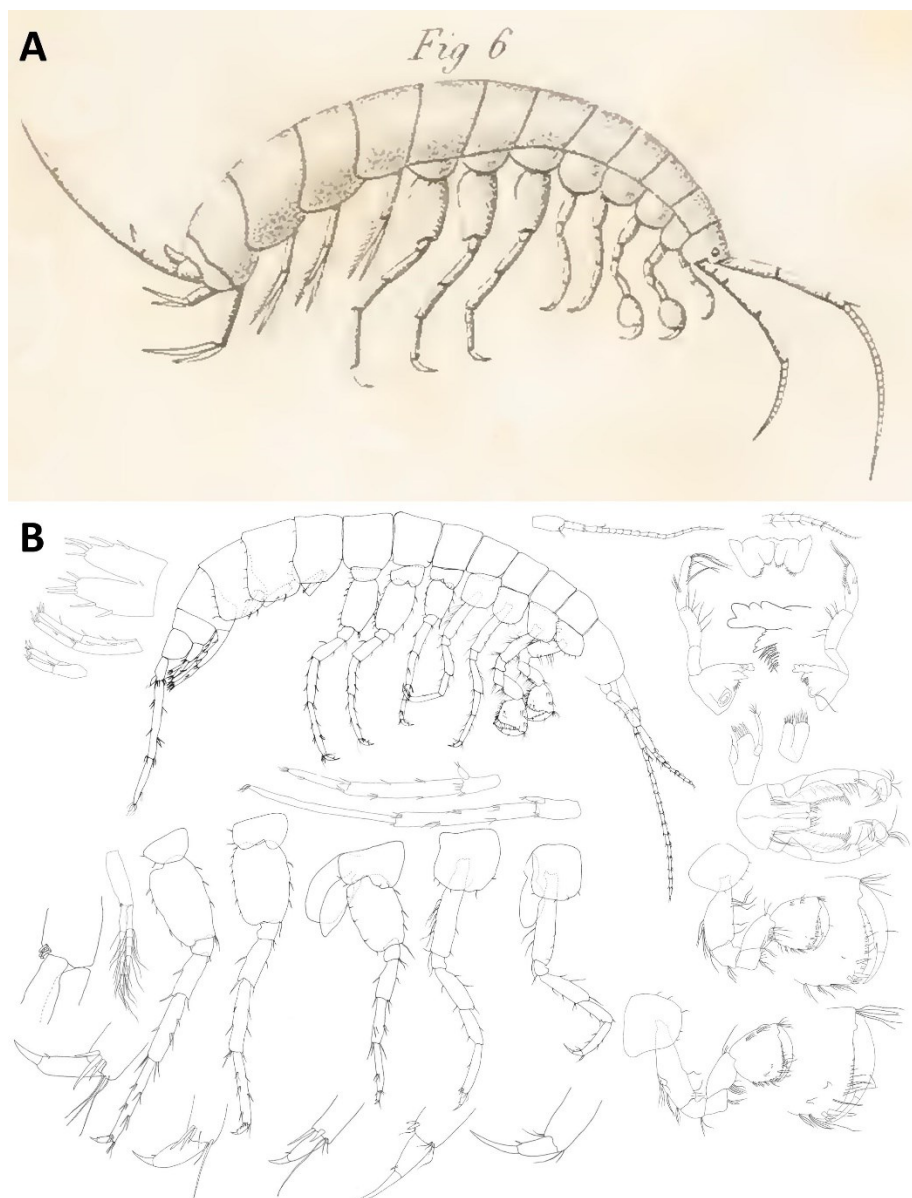
Balázs, G. & Angyal, D. (2013). A magyarországi vakbolharákfajok (Amphipoda: *Niphargus*) kiértékelő irodalmi áttekintése. *Állattani Közlemények*, 98(1–2), 111–9.

Balázs G., Angyal D. & Kondorosy, E. (2015). *Niphargus* (Crustacea: Amphipoda) species in Hungary: literature review, current taxonomy and the updated distribution of valid taxa. *Zootaxa*, 3974(3), 361–76.

3. 1. A téma ismertetése

A felemáslábú rákok rendjébe (Amphipoda) tartozó *Niphargus* nem a legnagyobb fajszámmal rendelkező troglobiont genusz a világon (Väniölä et al., 2008). A jelenlegi ismereteink szerint több mint 400 fajt számláló taxon a palearktiszi szubterrán életközösségeinek egyértelműen legmeghatározóbb eleme (Sket, 1999; Esmaeili et al., 2015). A magyarországi barlangi faunát illetően sem más a helyzet. A felemáslábú rákok utódgondozási szokásaiknak köszönhetően alacsony diszperziós képességgel rendelkeznek (Barnard & Karaman, 1991). Az alacsony diszperziós képességük, és a

fragmentált szubterrán élőhelyek együttes hatása miatt a populációk könnyen válnak genetikailag izolálttá magas fajdiverzitást eredményezve. A *Niphargus* fajok taxonómiája kiemelkedően bonyolult, melynek főbb okai a morfológiailag nehezen elkülöníthető fajok magas száma és a gyakori polimorfizmus (Fišer, 2012). A magyarországi *Niphargus* fajok kutatása igen intenzíven indult a múlt század első felében. Dudich Endre, és Méhelő Lajos számos fajleírást, és a fajokat érintő morfológiai, és taxonómiai problémát taglaló cikket közölt ebben az időszakban (pl. Dudich, 1924; 1926; 1927; 1932; Méhelő, 1927; 1937; 1941). A következő évtizedekben a taxon hazai kutatása, egy-két általános hidrobiológiai publikációt (Stiller 1953; Ponyi 1962; Bajomi 1969a, b; Lantos; 1986), és egy fajleírást (Karaman, G. S., 1986) leszámítva teljesen megszűnt. Ez alatt az időszak alatt nemzetközi szinten folyamatosan igen intenzív kutatás folyt, melynek köszönhetően számottevően bővült a taxonról rendelkezésre álló ismeretanyag és jelentősen megnőtt a fajok és az elkülönítésükre használatos morfológiai bélyegek száma is (3. ábra).



3. ábra. *Niphargus* fajok elvárt morfológiai illusztrációinak változása: A) *N. longicaudatus* fajleírásához közölt rajz (Costa, 1851); B) *N. gebhardti* újrleírásához közölt rajzok összeszerkesztve (Angyal et al., 2015, módosítva).

Magyarországon 27 faj előfordulásáról van irodalmi adat. Muskó (2007) összefoglaló munkájában 15 fajt sorol fel: (*Niphargus foreli* HUMBERT, 1877, *N. forroi* G. KARAMAN, 1986, *N. gebhardti* SCHELLENBERG, 1934, *N. hrabei* S. KARAMAN, 1932, *N. hungaricus* MÉHELÝ 1937, *N. leopoliensis* JAWOROWSKY, 1893, *N. longicaudatus* A. COSTA, 1851, *N. magyaricus* MÉHELÝ 1941, *N. matrensis* MÉHELÝ 1941, *N. molnari* MÉHELÝ 1927, *N. puteanus* C. L. KOCH, 1836, *N. stygius* (SCHIÖDTE, 1847), *N. tatrensis* WRZESNIOWSKY, 1890 *N. thermalis* DUDICH,

1941, and *N. valachicus* DOBREANU & MANOLACHE, 1933. További 12 faj említése található egyéb vonatkozó irodalmi forrásokban (pl. Dudich, 1932; 1934; 1941b; 1943; Hankó, 1924; Méhelý, 1941): (*N. aggtelekiensis* DUDICH, 1932, *N. dudichi* HANKO, 1924, *N. baloghi* DUDICH, 1940, *N. mediodanubialis* DUDICH, 1941, *N. pater*, *N. ginsiensis*, *N. parvus*, *N. beldy*, *N. budensis*, MÉHELÝ, 1941, *N. effusus*, *N. korosiensis*, *N. kochianus stygocharis*, DUDICH, 1943). A lista alapjául szolgáló fajleírások, említések, és előfordulási adatok mostani tudásunk tükrében számos esetben megkérdőjelezhetőek. A megfelelő taxonómiai ismeretek elengedhetetlenül fontosak minden további kutatáshoz, hiszen csak biztos alapokkal lehetséges megfelelő kérdéseket feltenni, mintavételezni és értékelni a kapott eredményeket. Sajnálatos módon a Magyarországról leírt fajok közül mindössze egynek (*N. forroi*) lelhető fel a típuspéldánya, ami jelentősen nehezíti a taxonómiai revíziót. A fentebb felsorolt 27 fajt kiindulási alapnak tekintve irodalmi adatok, gyűjtés, és morfológiai vizsgálatok segítségével állítottam össze a hazai *Niphargus* fajok listáját, kitérve további lehetséges fajokra is. Az elemzés alapját kettő, a témában korábban megjelent cikkem (Balázs & Angyal, 2013; Balázs et al., 2015) képezi, de az azóta általam végzett gyűjtések, morfológiai és genetikai vizsgálatok számos faj megítélésében jelentős változásokat hoztak, míg a vonatkozó irodalom további tanulmányozása a kiindulási fajlista bővülését eredményezte.

3.2. Anyag és módszer

A vizsgálat során a fellelhető irodalom alapos elemzése volt az első lépés, ideértve a hazánkból jelzett fajok eredeti leírásait, és azok elterjedési adatait is. Az irodalmi adatokat ezután a mai morfológiai, és elterjedési elképzeléseinkkel vetettem egybe, tovább szűkítve a fajok listáját. A valid, vagy feltételezhetően valid fajok esetében, ahol erre szükség volt, intenzív terepi mintázást, és a gyűjtött példányok morfológiai vizsgálatát végeztem el. A terepi gyűjtéseket, és bejárásokat 7 régióhoz tartozó 40 helyszínen végeztem összesen 73 alkalommal (1. táblázat). A begyűjtött példányok feldolgozása a nemzetközi gyakorlatnak megfelelően történt a Fišer és munkatársai (2009) által javasolt egységesítést, és összehasonlítást biztosító módszertan szerint. A tisztított, és festett példányok preparálásához Leica MZ75, és Leica M125 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) sztereomikroszkópokat használtam. A morfológiai

mérések az AnalySIS programcsomag felhasználásával, egy számítógéppel összekötött Zeiss Axioscope II mikroszkóppal történtek. Az elemzésbe 230 morfológiai karaktert vontam be, melyeket Excel táblázatokba rögzítettem. A gyűjtött példányok, és a preparátumok a Magyar Természettudományi Múzeumban kerültek elhelyezésre. Néhány taxon helyzetének tisztázásához lehetőség volt genetikai vizsgálatok eredményeit is felhasználni. A genetikai vizsgálatoknál alkalmazott módszerek a dolgozat filogenetikai részében kerülnek ismertetésre.

Régió	Barlang neve	Régió	Barlang neve
Bükk	Bolhási-Jávorkúti-barlangrendszer	Aggteleki-karszt	Baradla-Domica-barlangrendszer
Bükk	Szivárvány-Sebes-barlangrendszer	Aggteleki-karszt	Baradla Rövid-Alsó-barlang
Bükk	Kecske-lyuk	Aggteleki-karszt	Szabadság-barlang
Bükk	Speizi	Aggteleki-karszt	Béke-barlang
Bükk	István-lápai-barlang	Aggteleki-karszt	Kossuth-barlang
Bükk	Szepesi-Láner-barlangrendszer	Aggteleki-karszt	Rákóczi 1. sz. barlang
Bükk	Létrási-vizesbarlang	Aggteleki-karszt	Rákóczi 2. sz. barlang
Bükk	Mexikó-völgyi-víznyelőbarlang	Aggteleki-karszt	Meteor-barlang
Bükk	Diabáz-barlang	Aggteleki-karszt	Vass Imre-barlang
Bükk	Vár-tetői-barlang	Mecsek	Abaligeti-barlang
Bükk	Viktoria-barlang	Mecsek	Mánfai-kőlyuk
Bükk	Bányász-barlang	Mecsek	Gilisztás-víznyelőbarlang
Bükk	Nagykőmázsa-völgyi-víznyelőbarlang	Mecsek	Spirál-víznyelő
Bükk	Garadna-forrásbarlang	Mecsek	Szajha-felső-víznyelőbarlang
Bükk	Szalajka-forrásbarlang	Mecsek	Trió-barlang
Visegrádi-hegység	Dömös táró	Mecsek	Vadetetős-víznyelőbarlang
Budai-termálkarszt	Molnár János-barlang	Mecsek	Orfűi Vízfő-barlang
Budai-termálkarszt	Gellért-ősforrás	Villányi-hegység	Beremendi-kristálybarlang
Budai-termálkarszt	Török-forrás	Kőszegi-hegység	Jávor-forrás
Budai-termálkarszt	Malom-tó	Kőszegi-hegység	Borha-völgyi táró

1. táblázat. Bejárások, és gyűjtési helyek jegyzéke.

3.3. Eredmények

Az összes jelenleg rendelkezésre álló információ alapján megállapíthatjuk, hogy ma Magyarország területén összesen nyolc valid *Niphargus* faj fordul elő. Ez a szám összehasonlítva a kiindulási 27 fajjal alacsonynak mondható, de biztosan állíthatjuk, hogy a hazai fajok száma további kutatásokkal, és a meglévő eredmények felhasználásával növekedni fog. A már megtalált, de még le nem írt fajokat, és a

feltáratlan földrajzi régiókban rejlő potenciált is figyelembe véve, jelenlegi ismeretanyagunk alapján további hat-hét faj jelenlétére lehet számítani.

3.3.1. A történeti Magyarország területéről leírt *Niphargus* fajok, melyek hazai előfordulása nem valószínű

Niphargus dudichi HANKÓ, 1924

A legkorábban hazánkból leírt faj. A történeti Magyarország területéről, a ma Szlovákiához tartozó Nagysalló (Tekovské Lužany) egyik kútjából gyűjtött példányok szolgáltak a leírás alapjául. A leírás igen részletes, és sok rajzot tartalmaz, de számos ma már bevett karakter nem szerepel benne. Egyes szerzők továbbra is valid fajként kezelik (pl. Stloukal, 2004), míg mások szerint taxonómiai revízió lenne szükséges genetikai vizsgálatok bevonásával (Kováč et al., 2014), mivel a faj morfológiailag más fajokhoz igen hasonló.

Niphargus baloghi DUDICH, 1940

A faj típuslelőhelye a ma Ukrajnához tartozó Szolyvai (Svalyava) járásban található Kerecke (Kerecki) falu környéki kutak, és vízfolyások (Dudich, 1940). A faj morfológiailag igen hasonló a *N. pater* MÉHELÝ, 1941 fajhoz, mely romániai előfordulású. Érdekes módon a román szakirodalomban inkább a *N. baloghi* kerül említésre, többnyire a biztosan téves *N. puteanus baloghi* alfaji megnevezéssel (pl. Cărașu et al., 1955).

Niphargus pater MÉHELÝ, 1941

Méhelý (1941) *Niphargus* fajokról szóló összefoglaló munkájában ismerteti a fajt. A részletes morfológiai információkat tartalmazó leírásban a mai Románia területén fekvő Máramaros (Maramureș) megyei Kisnyíres-barlangot (Mesteacăn) jelöli meg típuslelőhelyként. A jelzett barlang a változó földrajzi neveknek köszönhetően sajnos nem azonosítható be teljes bizonyossággal. A leírásban a szerző felhívja a figyelmet a *N. baloghi* fajjal való hasonlóságokra és felsorolja a megkülönböztető bélyegeket. Az általa

felsorolt eltérések java része azonban a rágógyomor sertézettségére vonatkozik, ami nem bevett morfológiai különbségtétel, és így nehéz összehasonlításra alkalmazni. Talán éppen ennek köszönhető, hogy bár későbbi szerzők a faj taxonómiai státuszát nem kérdőjelezik meg, ugyanakkor a fajnév használata nem terjedt el.

***Niphargus effusus* DUDICH, 1943**

A fajt a Körös-menti talajvizekből Cappuis (1944) által gyűjtött mintákból írta le Dudich két másik új fajjal együtt. A típuslelőhelyről annyi információ derül ki, hogy a mai Romániához tartozó, Bihar megyei (Judetul Bihor) Barátka (Bratca) falu környékéről származott a minta. A leírásban Dudich (1943) a "foreli-gruppe"-hoz sorolja a fajt. Később Cărauşu (1955) *N. foreli effusus* alfajként említi meg, de ez a besorolás nem vált elfogadottá.

***Niphargus korosensis* DUDICH, 1943 (eredetileg mint *Niphargus körösensis*)**

Az előbbi fajhoz hasonlóan a Körös menti talajvizekből került leírásra a faj, de barlangi előfordulása is említve van. Dudich a "foreli"-csoportozáshoz (foreli-gruppe) sorolja a fajt. Később Cărauşu (1955) *N. foreli korosensis* alfajként említi meg, de ez az alfaji besorolás nem terjedt el.

***Niphargus stygocharis stygocharis* DUDICH, 1943**

Szintén a Körös menti gyűjtés eredménye, Barátka (Bratca) falu mellől. A szerző a *N. kochianus* BATE, 1959 alfajaként írja le a taxont *N. kochianus stygocharis* néven. A *N. kochianus* egyike a legkorábban leírt fajoknak, és ez a tény sokáig téves meghatározásokat, besorolásokat eredményezett (lásd még: *N. foreli*, *N. longicaudatus* etc.). Később Karaman G. S. (1976) a taxont nominális alfajként *N. stygocharis stygocharis* néven említi az általa *N. stygocharis italicus* névvel jelzett olaszországi alfaj leírásában.

3.3.2 Téves határozás vagy taxonómiai változás okán faunalistánkból kizárt

Niphargus fajok

***Niphargus stygius* (SCHIÖDTE, 1847)**

A faj hazai előfordulását Frivaldszky (1865) jelezte a Baradla-barlangból. A faj elterjedése a Dinári-hegység észak-nyugati, és az Alpok déli területére esik. A nyilvánvalóan téves meghatározás arra vezethető vissza, hogy Frivaldszky vizsgálatakor összesen öt leírt *Niphargus* faj volt ismert (*N. longicaudatus* A. COSTA, 1851, *N. puteanus* KOCH, 1836, *N. fontanus* BATE, 1859, *N. kochianus* BATE, 1859), és ezek közül a Baradlában fellelt példányok leginkább a *N. stygius* fajra hasonlítottak. A hazai irodalomban ez a téves meghatározás sokáig, egészen a *N. aggtelekiensis* leírásáig (Dudich, 1932), fennmaradt (e. g. Bokor, 1921; Dudich, 1924). A *N. stygius* előfordulását hasonlóan tévesen szintén jelezte Daday (1884) a ma Romániához tartozó Kisnyíres-barlangból. Erről a lelőhelyről írta le később Méhelý (1941) a *N. pater* fajt.

***Niphargus longicaudatus* (A. COSTA, 1851)**

A faj egyike a legkorábban leírt *Niphargus* fajoknak (Costa, 1851, 1857). Hazai említése Schellenberg (1940) publikációjához köthető, melyben a *N. hungaricus* fajt a *N. longicaudatus* alfajaként kezeli *N. longicaudatus hungaricus* néven. A *N. longicaudatus* elterjedése irodalmi adatok alapján igen széles (pl. G. S. Karaman 1989), az ilyen nagy elterjedési területeket *Niphargus* fajok esetében azonban fenntartásokkal érdemes kezelni (Trontelj et al., 2009). A Schellenberg által javasolt alfaji besorolás nem talált elfogadásra más szerzőknél. A genetikai vizsgálatok alapján a *N. hungaricus* nem közeli rokona a *N. longicaudatus* fajnak, így az utóbbi semmi esetre sem része a hazai faunának.

***Niphargus puteanus* (C. L. KOCH, 1836)**

Az egyébként ma már Regensburg (Németország) részévé vált Weichselmühle falu kútjaiból eredetileg *Gammarus puteanus* néven leírt faj hazai említése több okra vezethető vissza. Magyarország mai területéről, egész pontosan a Bátorligeti-lápból, és Budapestről Dudich jelzi előfordulását. A Bátorligeti-láp esetében egy a *N. puteanus* fajhoz igen hasonló fajt említ (Dudich, 1926), melyet később *N. mediodanubialis* néven ír le (Dudich, 1941a). A budapesti előfordulás említése (Dudich, 1927) egy kritika nélküli adatátvétel Margó Tivadar (1879) munkájából, aki az Orczy-kert tavában gyűjtött vakrákokat azonosította tévesen (Dudich, 1941b). A mai ismereteink alapján a Bátorligeti-láp egyedei valójában a *N. valachicus* fajhoz, míg kevésbé bizonyíthatóan a budapesti egyedek a *N. hrabei* fajhoz tartozhattak. A történeti Magyarország területéről is több *N. puteanus* előfordulás található az irodalomban. A faj zágrábi előfordulását Dudich (1927) jelzi forrásmegjelölés nélkül. A többi említés később nem elterjedt alfaji besorolásoknak köszönhető, és a mai Románia területéről való: *N. puteanus banaticus* DOBREANU & MANOLACHE, 1936, *N. puteanus (illidzensis) dalmatinus* SCHÄFERNA, 1922 (Doboreanu & Manolache, 1936), *N. puteanus baloghi* (Cărauşu 1955). A kor (sokszor azóta is fennálló) taxonómiai bizonytalanságait jól jellemzik Dudich (1927) saját kutatásaira is vonatkoztatott sorai: ...*Niphargus*-fajaink meghatározásai, az újabban leírt *N. Dudichi* HANKÓ és *N. Molnári* MÉHELY kivételével, csupán történeti értékűek, mert e nem rendszertana csak most van kialakulóban...

***Niphargus foreli* HUMBERT, 1876**

A *N. foreli* hazai említése ahhoz köthető, hogy a Mecsek barlangjaiban előforduló *N. gebhardti* faj eredetileg a *N. foreli* alfajaként került leírásra *N. foreli gebhardti* névvel (Schellenberg, 1934). A *N. foreli* mély alpesi tavak alján fordul elő, a típuslelőhelye a Genovai-tó (Humbert, 1876). Tekintve a jelentős földrajzi távolságot, és a teljesen eltérő élőhelyi igényeket, a két faj közötti szoros rokonság valószínűtlen.

***Niphargus leopoliensis* JAWOROWSKY, 1893**

A *N. leopoliensis* hazai előfordulási adatai a Mecsek barlangjaiban élő *N. molnari* fajhoz köthetőek. Megkérdőjelezve a *N. molnari* faji besorolását több szerző is a *N. leopoliensis* alfajaként említi *N. leopoliensis molnari* néven (Schellenberg 1933; Gebhardt 1963; 1967). A *N. leopoliensis* típuslelőhelye a leírás idejében Lengyelországhoz tartozó, ma már Ukrán területen fekvő Lviv (Lwow) város egyik kútja (Jaworowsky, 1893).

***Niphargus mediodanubialis*, *Niphargus mediodanubialis f. aschizotelson* DUDICH, 1941**

A faj leírásában Dudich (1941a) különböző előfordulásokat ismertet (Révfülöp, Balatonrendes, Bátorliget) feltüntetve a populációk közötti morfológiai eltéréseket, különösen ami a *telson* alakját illeti, míg típusformaként a Szeged melletti lápok egyedeit tünteti fel. A révfülöpi populációt a *telson* alakja alapján *N. mediodanubialis f. aschizotelson* alfaji megnevezéssel jelzi. A leírásban a szerző kitér a *N. valachicus*, *N. hrabei* és *N. thermalis* fajokkal való nagyfokú hasonlóságra. A fajt később Karaman S. (1950) a *N. valachicus* fajjal szinonimizálja, felismerve, hogy a *telson* alakja, és tüskézettsége önmagában a legtöbb esetben nem megbízható elkülönítő bélyeg. A későbbi nem magyar irodalmakban ez a szinonimizáció egységesen elfogadott lett, míg a magyar faunisztikai publikációkban (Berczik, 1966; Dudich, 1967; Forró, 1990; Lantos, 1986; Megyeri, 1953; Ponyi, 1962; Stiller, 1953) továbbra is *N. mediodanubialis* szerepelt. Kivételt képez ez alól Muskó (1994) munkája, ahol a *N. mediodanubialis* a *N. valachicus* szinonimájaként van kezelve. Az elmúlt pár év *N. valachicus*, és *N. hrabei* populációkat érintő genetikai vizsgálatai egyértelművé teszik a szinonimizáció jogosságát (Copilaş-Ciocianu et al., 2017; 2018).

***Niphargus thermalis* DUDICH, 1941**

A fajt Dudich (1941c) írta le a Lukács Fürdő Malom-tavából az általa 1927-ben gyűjtött egyedek alapján. A leírás igen részletes, és számos rajzot tartalmaz. A szerző a leírásban összehasonlítja a fajt a *N. hrabei* és *N. valachicus* fajokkal több elkülönítő morfológiai bélyeget is felsorolva. A felsorolt morfológiai eltérések a *N. hrabei* esetében mai

tudásunk alapján beleférnek a faj morfológiai varianciájába. Kender (1939) a *N. thermalis* számos példányát gyűjtötte a Malom-tó limnobiológiai felmérése során. Egy későbbi felmérés alkalmával Berczik (1956) mindössze egyetlen példányt talált. A drasztikus egyedszám csökkenést a szerző a tóba betelepített díszhalaknak (*Poecilia reticulata*) tudta be. A legújabb kutatások alapján a tóban, és az azzal közvetlen hidrológiai összeköttetésben lévő Molnár János-barlangban előforduló *N. thermalis* egyedekként azonosított példányok bizonyosan a *N. hrabei* fajhoz tartoznak, saját kutatásaink alapján azoktól sem morfológiailag, sem genetikailag nem térnek el számottevően (Pérez-Moreno & Balázs et al, 2017; Copilaș-Ciocianu et al., 2017), tehát a *N. thermalis* fajt a *N. hrabei* junior szinonimájának kell tekintenünk.

3.3.3. Kétséges taxonómiai helyzetű *Niphargus* fajok

***Niphargus magyaricus* MÉHELÝ, 1941**

Méhelý (1941) *Niphargus* morfológiával foglalkozó összefoglaló munkájában említi a fajt. Jellemzésként az első fogóláb (*gnathopod*) óriástüskéje (*palmar spine*), és az azon található érzéksörte hossz-arányát adja meg, valamint a rágógyomor tüskéinek alakját ismerteti, és ezekről rajzokat is közöl. A rajzok feliratában Szeged szerepel, mint lelőhely. A szerző által ismertetett morfológiai jellemzők más fajleírásokban nem használatosak, a típuspéldány nem fellelhető, és a lelőhelyre vonatkozó információk is hiányosak. Mindezek fényében a *N. magyaricus* fajt *species inquirenda*-ként érdemes kezelni. Megjegyzendő, hogy Méhelý publikációjával egy időben Dudich szintén szegedi előfordulással írta le a *N. mediodanubialis* fajt (Dudich, 1940), így felmerül a lehetősége az azonosságnak, bár a bizonyítás nem lehetséges.

***Niphargus matrensis* MÉHELÝ, 1941**

A fajnév Méhelý előzőekben említett munkájában jelenik meg (Méhelý, 1941). A gyűjtés helyének Galyatető közeli forrást jelöl, további információ nélkül. A faj morfológiájára vonatkozóan mindösszesen annyi ismertet, hogy a *palma* ütközőtüskéje érzéksörtét visel, a *retinaculum*-ok száma több lehet mint kettő, a *telson* hosszúkás, és mélyen

hasított, valamint egy rajzot is közöl a *lacinia mobilis* felépítéséről. A szerző által ismerttetett morfológiai jellemzők más fajleírásokban nem használatosak, a típuspéldány nem fellelhető és a lelőhelyre vonatkozó információk is hiányosak. Mindezek fényében a *N. matrensis* fajt *species inquirenda*-ként érdemes kezelni.

***Niphargus beldyi* MÉHELÝ, 1941 (eredetileg mint *Niphargus Beldyi*)**

Szintén Méhelý 1941-es munkájában fordul elő a fajnév. A faj morfológiájára vonatkozó megjegyzés azonos a *N. matrensis* esetében ismertetettel, azzal a kiegészítéssel, hogy a jobb oldali *mandibula lacinia mobilis* részén 12-13 tüske található. A faj lelőhelyére vonatkozólag semmilyen információt nem közöl a szerző. Bár a *lacinia mobilis* 12-13 tüskéje, és a kettőnél több *retinaculum* ritka bélyegeknak számítanak, a lelőhelyi információ, és a típuspéldány hiányában mindenképp *species inquirenda*-ként kell kezelni a fajt.

***Niphargus budensis* MÉHELÝ, 1941**

A faj egyetlen közölt morfológiai bélyege (Méhelý, 1941) a *mandibula lacinia mobilis*, és *pars molaris* részei között fellelhető érzéksörték száma. Ez a Méhelý által a jelzett publikációban bevezetett határozójegy semmilyen más szerző egyetlen fajleírásában sem szerepel. A faj lelőhelyére vonatkozóan nem közöl információt a szerző, így csak a névből sejthetjük, hogy esetleg Budapest környékéről származott a vizsgált egyed. A hiányos információk miatt a faj *species inquirenda*.

***Niphargus ginsiensis* MÉHELÝ, 1941**

A faj közölt morfológiai bélyege az első *gnaphopod* serteképletére korlátozódik (Méhelý, 1941). A szerző nem közöl információt a lelőhelyről. Az elnevezés alapján feltehetőleg Kőszeg környékéről származott a minta. A hiányos információk miatt a faj *species inquirenda*.

***Niphargus parvus* MÉHELÝ, 1941**

A faj tanulmányában Méhelý (1941) a *N. matrensis*, és a *N. beldy* fajokkal egy csoportba tartozóként említi, közös jellemzőként felhozva, hogy a *palma* ütközőtüskéje érzéksörtét visel, a *retinaculum*-ok száma több lehet mint kettő, a *telson* hosszúkás, és mélyen hasított. A faj lelőhelyéről nem közöl adatot. A hiányos információk miatt a faj *species inquirenda*. Érdemes megjegyezni, hogy két évvel később Karaman, S. (1943) leírást közöl egy dél-szerbiai fajról, melyet *N. parvus* néven ismertet. Ezt a fajt azóta is valid fajként tartják nyilván. A tanulmányában Méhelý (1941) a *N. parvus* fajt *mihi* jelzéssel látta el, így tehát kizárható, hogy ugyanarról a fajról lenne szó.

3.3.4. Hazai előfordulású valid *Niphargus* fajok

***Niphargus hrabei* S. KARAMAN, 1932**

Az alapvetően felszíni faj a Duna alsó- és középső szakasza mentén elterjedt, ahol vízínövénnnyel benőtt lassú folyású és állóvizekben honos. Magyarországon az Alföldön, a Kisalföldön, a Duna mentén, a Dráva mentén és a Balaton vízgyűjtő területén fordul elő (Nosek & Oertel 1980; Borza et al. 2010; 2013). A faj egész elterjedési területéről származó populációin végzett genetikai vizsgálat szerint recens area expansió figyelhető meg (Copilaș-Ciocianu et al., 2017, 2018). A *N. hrabei*, és a *N. valachicus* elterjedése átfed, és sokszor szimpatrikus előfordulás is tapasztalható. A két faj együttes előfordulását az teheti lehetővé az azonos niche ellenére, hogy míg a *N. valachicus* nagyobb testméretével jobb kompetitor, addig a *N. hrabei* nagyobb toleranciát mutat a környezeti változókkal szemben (Copilaș-Ciocianu et al., 2017). A fajt eredetileg a dél-szlovákiai Párkány-Nána (Nana-Parkan) falu melletti tavakból írták le (Karaman, S., 1932) *N. tatrensis hrabei* néven. A típuslelőhely erőteljesen szennyezett, és a próbálkozásaink ellenére a töből a faj egyedeit nem sikerült gyűjteni. A faj elterjedési területe szokatlanul nagy: a Duna mentén Bajorországtól egészen a Fekete-tenger partján lévő Dobrogea-ig tart mintegy 1300 km lineáris távolságot ölelve fel (Copilaș-Ciocianu et al., 2017). Szubterrán előfordulása a Molnár János-barlanghoz köthető.

***Niphargus valachicus* DOBREANU & MANOLACHE, 1933**

A faj eredetileg *N. tatrensis valachicus* néven lett leírva a bukaresti (Románia) Dimitrie Brândză Botanikus Kert tavában talált példányok alapján (Doboreanu & Manolache, 1933). A leírás elég rövid, alig pár morfológiai jegyet és néhány rajzot közöl. Három évvel később a taxont ugyanazok a szerzők *N. valachicus* néven faji rangra emelik (Doboreanu & Manolache 1936). Karaman S. (1950) felveti, hogy a *N. mediodanubialis* a *N. valachicus* junior szinonimája. A genetikai vizsgálatok szerint a típuslelőhely(ek)ről gyűjtött feltehetőleg *N. mediodanubialis* példányok nem mutattak számottevő genetikai eltérést a *N. valachicus* populációk egyedeitől sem a COI, sem ITS markerek esetében, egyértelművé téve a szinonimizáció jogosságát (Copilaş-Ciocianu et al., 2017). A faj igen széles elterjedésű: a Kárpát-medencétől egészen a Kaszpi-tenger iráni partjáig előfordul (Copilaş-Ciocianu et al., 2017). Magyarországon sokfelé előfordul, és élőhelyei is változatosak, a hegyi patakoktól a nagyobb folyóágakig megtalálható (Borza et al., 2010; 2013; Kontchán, 2002; 2004; Kontchán et al., 2002; 2006), de érdekes módon a Kisalföldről eddig nem mutatták ki.

***Niphargus hungaricus* MÉHELY 1937**

A *N. hungaricus* az egyetlen idáig leírt hazai *Niphargus* faj, mely nem karsztos szubterrán élőhelyen él. Méhely (1937) a Kőszegi-hegység forrásaiból írta le a Jávor(Jámbor)-forrást jelölve meg típuslelőhelynek. Sajnálatos módon a jelzett forrásban nem sikerült megtalálni a fajt, és a többi forrást nem nevesíti a szerző a leírásban. A típuslelőhelyhez legközelebbi lelőhely a Borha-völgyi felhagyott bányatáró, mely mindössze 300 méterre található a Jávor-forrástól. A faj megnyúlt testalakja, és a táróban való jelenléte miatt feltételezzük, hogy a forrásokban való előfordulás esetleges, és a *N. hungaricus* valódi élőhelye a kőzet vízzel kitöltött repedéshálózata.

***Niphargus gebhardti* SCHELLENBERG, 1934**

A faj eredetileg a *N. foreli* alfajaként került leírásra (Schellenberg, 1934) *N. foreli gebhardti* néven. A típuslelőhely a Mecsekben található Abaligeti-barlang. A leírás

viszonylag kevés morfológiai bélyeget tartalmaz és rajzon is csak a *telson* és a második *gnathopod* került ábrázolásra. Egy évvel később Schellenberg (1935) újabb morfológiai bélyegeket közöl, maradva az alfaji besorolásnál. Pár évvel később Méhelý (1941) faji besorolást javasolt *N. gebhardti* néven olyan ritkának mondható bélyeg-kombinációkra alapozva mint, a pleopod három *retinaculum*-a, és a *lacinia mobilis* öt-hat *dentikulum*-a. Utólag Schellenberg morfológiai adatait elemezve értelmezhetővé válik a téves alfaji besorolás. A mai ismereteink alapján feltehetőleg az történt, hogy az általa vizsgálat mintában nem csak *N. gebhardti* fordult elő hanem *N. molnari* is, jelentős zavart okozva a morfológiai variancia megítélésében. A *N. molnari* faj Abaligeti-barlangban való jelenléte nem volt ismert ekkoriban, viszont számos karakter-kombináció varianciáját eltolja a *N. foreli* irányába. Méhelý meglátásai a *N. gebhardti* önálló faji státuszával kapcsolatban ma már kétséget kizáróan helyesnek tekinthetőek és érvei már akkor is meggyőzőek voltak, a későbbi munkákban mégis rendre megmaradt az alfaji besorolás (pl. Gebhardt, 1963, 1967). A faj az Abaligeti-barlangon kívül számos mecseki barlangban előfordul (Gebhardt 1934, 1963, 1967, Angyal & Balázs 2013a). A *N. gebhardti*, és a *N. molnari* gyakran fordul elő együtt különböző barlangokban. Fontos elkülönítő bélyegeiknek tisztázására újonnan begyűjtött példányok alapján volt lehetséges (Angyal & Balázs, 2013b). Mivel mind Schellenberg, mind Méhelý leírása mai szemmel igen hiányosnak tekinthető, és a típuspéldányok nem fellelhetőek, a faj újraleírása (Angyal et al. 2015) szükségszerű volt.

***Niphargus molnari* MÉHELÝ 1927**

A faj a mecseki Mánfai-kőlyukból lett leírva (Méhelý 1927). Az eredeti leírás igen kevés morfológiai bélyeget tartalmaz, és a szerző mindössze a törzs és a potroh lemezeiről közöl rajzokat. Schellenberg (1933) eleinte indoklás nélkül alfaji besorolással említi *N. leopolensis molnari* néven, de később (Schellenberg, 1935) az eredeti névvel és taxonómiai besorolással közöl további morfológiai bélyegeket. Az eredeti lelőhelyen kívül Gebhardt (1963) jelzi a faj előfordulását az Abaligeti-barlangból is. A Mánfai-kőlyuk vízkivételi célra való hasznosítása során jelentős emberi beavatkozások esett át. Valószínűleg ennek köszönhető, hogy intenzív próbálkozások ellenére sem sikerült *N. molnari* példányokat találnunk a barlangban (Angyal, 2012, Angyal & Balázs, 2013a). Bár

a típuslelőhelyről feltehetőleg kipusztult a faj, az elmúlt pár év intenzív faunisztikai kutatásainak köszönhetően a Mecsek számos barlangját a faj élőhelyeként tarthatjuk számon (Balázs et al., 2015). Mivel Méhely leírása Schellenberg kiegészítésével együtt is igen hiányosnak tekinthető, és a típuspéldányok nem fellelhetőek, a faj újraleírása (Angyal et al. 2015) szükségszerű volt.

***Niphargus aggtelekiensis* DUDICH, 1932**

Az Aggteleki-karszt Baradla-barlangjában talált *Niphargus* egyedeket először a *N. stygius* fajként azonosították (Frivaldszky, 1865, Bokor, 1921; Dudich, 1924). A részletesebb vizsgálatok eredményeképpen világossá vált, hogy ez téves meghatározás, és Dudich (1932, 1934) új fajként írta le *N. aggtelekiensis* néven. Schellenberg (1938a) ugyanakkor a Domica-barlangban talált egyedeket a *N. tatrensis* fajhoz tartozónak határozta meg. Mivel a két megnevezés gyakorlatilag ugyanannak, a ma már Baradla-Domica-barlangrendszernek nevezett barlangnak a bejáratok szerinti elkülönítése, ez nyilvánvalóan nem volt tartható különbségtétel. A *N. aggtelekinesis* biztosan közeli rokonságban van a *N. tatrensis* fajjal, de az elkülönülés mértéke pusztán morfológiai alapon nem mérhető fel, főleg mivel a *N. tatrensis* széles elterjedési területű, és igen variábilis megjelenésű. Ebben az esetben tehát nem csak arról van szó, hogy egy viszonylag korán leírt faj belezavar a faunisztikai felmérések fajmeghatározásaiba, hanem ténylegesen kétséges helyzet áll fent. A *N. tatrensis* csoport problematikáját korán felismerte Schellenberg, és többször próbálkozott annak feloldásával (Schellenberg, 1935; 1937). A próbálkozások során végül hét nehezen definiálható formát különített el, melyek közül az egyiket *N. tatrensis f. aggtelekiensis* névvel illette Dudich leírása alapján (Schellenberg, 1938b). Jól példázza a probléma nehézségeit, hogy később maga Dudich (1941b) is *N. tatrensis f. aggtelekiensis* néven említi a fajt. A mai tudásunk alapján, jóllehet a megbízható morfológiai elkülönítés még mindig komoly nehézségeket jelent, a *N. aggtelekiensis* fajt valid önálló fajként érdemes kezelni, mely vélekedést nem csak az általam végzett genetikai vizsgálat támasztja alá (lásd 4. fejezet), de a kifejezetten a "tatrensis"- csoportra irányuló még nem publikált vizsgálatok is megerősítik (Fabio Stoch személyes közlés). Saját morfológiai vizsgálataim alapján elmondható, hogy a Baradla-Domica-barlangrendszerben, a Kossuth-barlangban és a

Rákóczi 1.sz-barlangban gyűjtött *N. aggtelekiensis* példányok konzekvens elkülönítő morfológiai bélyegei mindössze a *telson* belső szélén -, és a maxilliped belső lebenyén található kiszélesedett tüskék alakjában érhető tetten (Balázs et al., 2015). Ezek alapján legalább is a hazai *N. tatrensis* fajhoz sorolt egyedektől elkülönül. Érdemes megjegyezni, hogy a bizonyosan a "tatrensis"- csoporthoz tartozó ausztriai populációk egyedeit a morfológiai hasonlóságok miatt gyakran *N. aggtelekiensis* fajhoz tartozókként határozzák meg (pl. Nesseman et al., 1995). Ez a pusztán morfológián alapuló gyakorlat az általam végzett genetikai vizsgálat eredményeinek alapján (lásd 4. fejezet) téves és csak a csoport morfológiai variációjában rejlő véletlen egybeesés eredménye (Fišer et al., 2010).

***Niphargus tatrensis* (WRZESNIEWSKY, 1890)**

A *N. tatrensis* hazai helyzete csak első pillanatra tűnik egyszerűnek. A Bükk barlangjaiban előforduló populációk egyedeinek morfológiája nagyon jól illeszkedik a törzsalak elfogadott jellemzőihez és bizonyos jegyekben konzekvensen elkülönül a *N. aggtelekiensis* fajtól. A *N. tartensis* eredetileg a Lengyel Tátra terültéről, Zakopane közeli kutakból gyűjtött példányok alapján lett leírva (Wrzesniewsky 1890). Pusztán morfológiai alapon azonosítva a "tartensis"- csoporthoz tartozó 23 populációt ismerünk (ideértve a *N. aggtelekiensis*, és *N. scophicauda* FIŠER, 2010 fajokat is). Ez alapján a csoport elterjedési területe kiterjed Szlovéniára, Ausztriára, Szlovákiára, Lengyelországra és Magyarországra, legalább hat, egymástól jól elkülönülő földrajzi területet érintve, melyek között számos a diszperziót, és a génáramlást akadályozó barriert lehet megnevezni. A csoport taxonómiája régóta vita tárgyát képezi a szakemberek körében, azonban a magas morfológiai variabilitás miatt ez idáig nem sikerült morfológiai alapú felosztást felállítani. A legutóbbi átfogó próbálkozás (Fišer et al. 2010) különböző múzeumokban őrzött példányok minden részletre kiterjedő morfológiai elemzése alapján is csak annyival jutott közelebb a megoldáshoz, hogy a szlovéniai populációt külön fajként *N. shophicauda* néven leválasztotta, míg a többi populáció esetében nem jutott meggyőző eredményre. A *N. tatrensis* magyarországi előfordulásáról mindezek után annyit mondhatunk bizonyosan, hogy az általunk a Bükk több barlangjában gyűjtött egyedek (Balázs et al., 2015) meggyőző mértékben

elkülönülnek a *N. aggtelekiensis* fajtól, míg a *sensu stricto N. tatrensis* (Lengyel populációk) fajjal való taxonómiai helyzete bizonytalan. A csoport minden ismert populációjára kiterjedő genetikai vizsgálat folyamatban van (Fabio Stoch személyes közlés), és minden bizonnyal valamilyen mértékben tisztázni fogja a helyzetet. Ameddig az eredmények publikálásra nem kerülnek leghelyesebb a fajt hazai fauna részének tekinteni észben tartva a lehetséges változásokat.

***Niphargus forroi* G. KARAMAN, 1986**

A *N. forroi* a Bükkben található Diabáz-barlang felszínhez közeli forrásából lett leírva (Karaman, G. S., 1986). A holotípus a szerző birtokában van ugyan, de a paratípusok megtalálhatóak a Magyar Természettudományi Múzeum gyűjteményében. A leírás igen részletes és számos rajzot tartalmaz, megfelelve ezzel a modern *Niphargus*-taxonómia követelményeinek. A faj nagyon sokáig csak a típuslelőhelyről volt ismert, de az elmúlt évek gyűjtőmunkájának köszönhetően számos más bükki barlanggal bővült az ismert lelőhelyek száma (Balázs et al., 2015). Míg a fajjal szimpatrikusan előforduló *N. tatrensis* a barlangi patakokban fordul elő, addig a *N. forroi* lelőhelyei a csepegővizes medencék, ami könnyen jelentheti azt, hogy egy alapvetően az epikarsztban élő fajjal van dolgunk.

3.3.5. Egyéb lehetséges fajok

A Molnár János-barlangban zajló saját vizsgálataimnak köszönhetően kettő új, még leírásra váró *Niphargus* faj került elő, melyekre a dolgozat további részében *N. sp. nov.* 1. és *N. sp. nov.* 2. megjelöléssel hivatkozom. A morfológiai és genetikai vizsgálatok tanúsága szerint, minden kétséget kizáróan új, a többi leírt fajtól és egymástól is jól elkülönülő fajokról van szó.

A Visegrádi-hegységben Dömös mellett egy felhagyott bányatáróban szintén egy leírás alatt lévő, morfológiailag a többi ismert fajtól jól elkülöníthető *Niphargus* faj került gyűjtésre, melyre *N. sp. nov.* 3. jelöléssel hivatkozom a továbbiakban.

Ezeket kívül szinte biztosra vehetjük, hogy más, nem karsztos területekről is várhatóak felfedezések. Különösen igaz lehet ez, ha figyelembe vesszük a Méhelý által jegyzett (Méhelý, 1941) tanulmány *N. matrensis*, és *N. ginsiensis* megnevezéseit. Szintén

a nem karsztos területekre hívja fel a figyelmet a Zemplén Szlovák oldaláról nemrégiben leírt *N. plurispinosus* HUDEC & MOCK, 2014 is, melynek magyarországi előfordulási adata egyelőre ugyan nincs, de felbukkanására minden valószínűleg szerint számíthatunk.

3.4. Diszkusszió

A hazai *Niphargus* fajokra vonatkozó ismereteink esetében egyértelműen tetten érhető a kutatásukban kihagyott jelentős időszak. A régi leírások sokszor pontatlanok, kevés információt tartalmaznak, és a típuspéldányok, egy fajt leszámítva (*N. forroi*), hiányoznak. Az elmúlt pár évtized során egyértelművé vált a barlangbiológiával foglalkozó kutatók körében, hogy a taxon magas fajszáma, eltérő élőhelyekhez való alkalmazkodása, változatos morfológiája és a különböző fajok szimpatrikus előfordulása miatt kiváló modellként szolgálhat általános kérdések vizsgálatához. Ez akkor is igaz ha Fišer (2012) szavaival élve: “A *Niphargus* genusz a taxonómusok rémálma (*Niphargus is a nightmare for taxonomists*)”. Az állítás sajnos alkalmazható a magyarországi fajokra is. Jól szemlélteti ezt, hogy még a viszonylag kevés fajjal foglalkozó és nem sok publikációt felvonultató hazai látkép is igen zavaros, számos vitatott helyzettel bonyolítva. Az elmúlt pár év intenzív gyűjtő és kutató munkájának köszönhetően a kép némileg tisztult, de számos kérdéses pont maradt, melyek megoldása remélhetőleg nem várat sokáig magára. Az irodalomban fellelhető 27 hazai említésű fajból, eddig mindössze 8 valid faj tagja ismert a magyar faunának (4. ábra). Ez az igen jelentős különbség számos, az előbbieken részleteiben kifejtett oknak tudható be.

Sajnos a genusz hazai kutatására jellemző mértékű lemaradás nehezen hozható be, azonban már ezekből a kezdetieknek tekinthető lépésekből is jól látszik, hogy a terület számos meglepetést tartogat. Mi sem bizonyítja ezt jobban, mint hogy a terepi munka során, az ezt megelőzően nem kutatott földrajzi területekről rendre új fajok bukkantak elő, amelyek a leírásuk után arányaiban jelentősen növelik majd a hazai előfordulású *Niphargus* fajok számát. A genetikai vizsgálatok további alkalmazása szintén bizonyosan hozzájárulhat nem csak a filogenetikai viszonyok tisztázásához, de újabb, akár kriptikus fajok felfedezéséhez is (Flot et al., 2010; Trontelj et al., 2009). A vizsgálathoz elvégzett intenzív gyűjtőmunka nem elhanyagolható eredménye, hogy bár a nemzetközi szakirodalomban a szubterrán fajoknál gyakran hangoztatott magas fokú endemizmus

általánosságban nálunk is megállja a helyét, a szintén gyakran felemlített, egyetlen barlangra korlátozott előfordulás a legtöbb hazai esetben csak az elégtelen mintavételezés miatt tűnhetett igaznak.



4. ábra. A magyarországi említésű *Niphargus* fajok földrajzi megjelenítése és taxonómiai státuszuk. A *species inquirenda* *Niphargus* Bélydi, és *Niphargus parvus* fajok földrajzi adattal nem rendelkeznek, ezért a térképi megjelenítésen nem szerepelnek. (Balázs et al., 2015, módosítva)

4. A hazai *Niphargus* fajok filogenetikai vizsgálata

Copilaș-Ciocianu, D., Fišer, C., Borza, P., Balázs, G., Angyal, D. & Petrusek, A. (2017). Low intraspecific genetic divergence and weak niche differentiation despite wide ranges and extensive sympatry in two epigeal *Niphargus* species (Crustacea: Amphipoda). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 181, 485–99.

4.1. A téma ismertetése

A *Niphargus* genusz magas fajszámával, és a morfológiailag igen hasonló fajok gyakori előfordulásával számos taxonómiai szempontból kétséges helyzetet hordoz magában. A molekuláris módszerek elterjedésével (Fišer et al., 2008), és ezzel párhuzamosan a megbízható morfológiai karakterekre vonatkozó ismeretek bővülésével (Fišer et al., 2009) sok kérdés tisztázhatóvá vált. Az integratív taxonómiai módszerekkel végzett kutatások rámutattak számos a nemre jellemző sajátosságra is, melyeket érdemes figyelembe venni a különböző vizsgálatok során. A szubterrán élőhelyek többnyire izoláltak, így bennük gyors fajképződések mehetnek végbe. Az izoláció eredményeképpen létrejövő, sokszor nagy mértékű genetikai különbségek az élőhelyi feltételek azonossága miatt számos esetben nem járnak együtt észlelhető morfológiai változásokkal kriptikus fajokat eredményezve. Az ebben a témában elvégzett vizsgálatok tanúsága szerint a kriptikus *Niphargus* fajok kifejezetten gyakoriak (Lefébure et al., 2006; Trontelj & Fišer, 2009), és a jelenség főképp azokra a taxonokra jellemző melyeket korábban széles elterjedésűnek gondoltak (Lefébure et al., 2007; Fišer & Zagamajster, 2009; Trontelj et al., 2009; Eme et al., 2018). A csupán morfológiai jegyekre épülő korábbi leszármazástani elméletek a genetikai vizsgálatok elterjedésével rendre tévesek bizonyultak. A hasonló morfológiával rendelkező fajok előfordulási mintázata régebben komoly fejtörést okozott a téma kutatóinak, mert ezek a mintázatok nem álltak összhangban azzal a feltételezéssel, hogy a szubterrán fajok magas fokú specializációjuk, és a potenciális élőhelyek fragmentáltsága miatt korlátozott diszperziós képességgel rendelkeznek. Az elmúlt évek integratív taxonómiai vizsgálatainak tanúsága szerint egyes *Niphargus* fajok főképp a konvergens evolúció eredményeképpen hasonlítanak egymásra morfológiailag, míg a rokonsági viszonyok alig játszanak szerepet az ismétlődő

morfológiai bélyegek tekintetében (Trontelj et al., 2012; Petkovic et al., 20115). A legjobb szemléltető példa erre a hazánkban élő két felszíni faj, a *N. hrabei* és a *N. valachicus* esete, melyek egymástól független ágakon fejlődve váltottak át másodlagosan felszíni életmódra, és valószínűleg a szinte azonos élőhelyi feltételeknek köszönhetően morfológiailag egymáshoz igen hasonlóak (Copilaș-Ciocianu et al, 2017, 2018).

A hazai fajokról a mi vizsgálataink megkezdése előtt semmilyen genetikai információ nem állt rendelkezésre, mely annak köszönhető, hogy a genusz hazai kutatása a genetikai vizsgálatok elterjedése előtt megrekedt. Az elmúlt években a folyamatos adatfeldolgozásnak köszönhetően részleges információközlések születtek egyes fajokra vonatkozóan (Angyal et al, 2015; Copilaș-Ciocianu et al, 2017, 2018), de ezek a vizsgálatok összesen négy hazai fajt érintettek (*N. gebhardti*, *N. molnari*, *N. hrabei*, *N. valachicus*). Jelen kutatással ezt a hiányt szándékozom pótolni, oly módon, hogy mind a nyolc valid hazai faj, és a Molnár János-barlangban felfedezett két leírásra váró faj genetikai információinak felhasználásával megpróbálom a rokonsági viszonyait tisztázni. Mindehhez a földrajzilag közel előforduló, vagy morfológiailag hasonló, hozzáférhető genetikai információval rendelkező taxonok bevonásával létrehozott törzsfákat elemzem. Más földrajzi területeken korábban végzett hasonló próbálkozásokból tudható, hogy a sok *Niphargus* faj bevonásával készült törzsfákon alapuló elemzéseknek komoly korlátai vannak. Ez főként arra vezethető vissza, hogy az általánosságban vizsgált génszakaszok, melyek sok fajra nézve állnak rendelkezésre (Fišer et al., 2008), gyakran nem bizonyulnak elegendőnek jó támogatottságú elágazásokkal rendelkező fák készítéséhez (pl. Meleg et al., 2013; Copilaș-Ciocianu et al., 2018). Az értelmezési korlátok ellenére a törzsfák alapján, szem előtt tartva az alacsony támogatottságú elágazások keltette bizonytalan helyzeteket, levonhatunk bizonyos következtetéseket. Ezen túlmutatóan az ilyen jellegű vizsgálatok egyaránt alapvető fontosságúak további kutatási irányok kijelöléséhez és specifikusabb kérdésekre vonatkozó vizsgálatok megtervezéséhez is. Magyarországra jellemző, hogy a *Niphargus* fajok számára megfelelő szubterrán élőhelyek fragmentáltan fordulnak elő. Ennek alapján az várható, hogy az egyes élőhelyeken előforduló *Niphargus* fajok különböző fejlődési ágakból kerülnek ki, és a tapasztalt előfordulási mintázat inkább mutat összefüggést földtörténeti változásokkal, mint földrajzi távolságokkal. Az eredmények

fényében a jelen vizsgálatban alkalmazott genetikai módszerek nem bizonyultak maradéktalanul alkalmasnak az iménti felvetéssel kapcsolatos egyértelmű kijelentések megfogalmazásához, de több faj esetében értékes információval szolgálnak taxonómiai kérdések tisztázásához, és segítik megérteni az egyes élőhelyek *Niphargus* faunájának kialakulását.

4.2. Anyag és módszer

4.2.1. Gyűjtések

A vizsgálatba bevont hazai fajok többsége (*N. molnari*, *N. gebhardti*, *N. aggtelekiensis*, *N. hungaricus*, *N. forroi*) magyarországi típuslelőhelyről került leírásra. Ezen fajok esetében a gyűjtés egyeléses módszerrel történt lehetőség szerint a típuslelőhelyekről, ez azonban két faj esetében nem volt megvalósítható. A *N. hungaricus* típuslelőhelyeként megjelölt Jávor-forrás (Méhely, 1937) megváltozott morfológiája nem teszi lehetővé a gyűjtést, így a faj egyedeit a legközelebbi ismert lelőhelyről, a forrástól mintegy 300 méter távolságra található Borha-völgyi tóból gyűjtöttük. A *N. molnari* típuslelőhelyén a Mánfai-kőlyukban, feltehetőleg a barlang ipari hasznosítása miatt már nem mutatható ki (Angyal & Balázs, 2013b), így a fajt a legközelebbi ismert lelőhelyéről, az Abaliget-barlangból gyűjtöttük. A *N. aggtelekiensis* esetében a típuslelőhelyen kívül (Baradla-Domica-barlangrendszer) a hidrológiailag elkülönült, a Szalonnai-hegység területén lévő Rákóczi 1. sz. barlangból is gyűjtöttünk mintát. A széles elterjedésű felszíni fajoknál (*N. hrabei* és *N. valachicus*) a gyűjtések ismert hazai lelőhelyekről történtek. A fajokkal kapcsolatos számos populáció bevonásával végzett, részletes genetikai vizsgálatok tanúsága szerint a két fajt rendkívül alacsony genetikai variancia jellemzi (Copilaș-Ciocianu et al, 2017, 2018), így feltételezhattük, hogy a gyűjtés helyszíne érdemben nem befolyásolja a vizsgálat eredményét. A *N. tatrensis* magyarországi előfordulása igen bizonytalan (lásd korábban), ennek megfelelően a vizsgálatba bevont minta magyarországi lelőhelyről származó, morfológiai bélyegek alapján meghatározott egyed volt. A vizsgálatba szintén bevontuk a *N. sp. nov. 1.*, és *N. sp. nov. 2.* fajokat, melyek egyetlen ismert előfordulási helyükről a Molnár János-

barlangból kerültek gyűjtésre. A gyűjtött példányokat a DNS kivonásig 96%-os etanolban tartósítottuk. A törzsfakészítéshez felhasznált további 96 taxon (beleértve a külcsoportot is) szekvenciáiból 10 a GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) adatbázisból, míg a maradék 86 taxonra vonatkozó szekvenciák a Ljubljana Egyetem SubBio adatbázisából származik (1. függelék). A törzsfa létrehozásához adatbázisokból felhasznált taxonok között 92 *Niphargus* minta található, valamint három nem a *Niphargus* genuszba sorolt faj (*Carinurella paradoxa* SKET, 1964, *Haploginglymus geos* JURANDO-RIVERA, 2017, *Haploginglymus morenoi* IANILLI, 2009) melyekről korábbi vizsgálatokból tudható, hogy genetikailag a *Niphargus* nembe tartoznak (Jurando-Rivera et al., 2017, Cene Fišer személyes közlés). A külcsoport a *Pseudoniphargus gorbeanus* NOTENBUM, 1986 volt, mely biztosan nem tartozik a nembe és minden vizsgálni kívánt génszakaszra vonatkozó szekvenciája rendelkezésre áll.

4.2.2. DNS kivonás és PCR

A DNS kivonása a járólábak, és az első pár csáp felhasználásával QIAamp DNA Microkit (Qiagen), vagy GenElute Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma Aldrich) használatával történt a gyártó előírásai alapján. A vizsgált génszakaszok kiválasztásánál elsődleges szempont volt a más fajokkal való összevethetőség. A *Niphargus* fajoknál legelterjedtebben vizsgált génszakaszok a mitokondriális protein kódoló Citokróm-oxidáz I. alegység (*COI*), a 28S rDNS (28S 22, 28S 35) fragmentum, és a H3 hiszton kódoló szakasz (Fišer et al., 2008). A PCR során a *COI* esetében a LCO 1490 – HCO 2198 (Folmer et al. 1994), a 28S esetében a 28S lev2 – 28S des2, vagy a 28S rtest2 (Verovnik et al. 2005, Zakšek et al. 2007), míg a H3 esetében a H3aF2–H3aR2 (Colgan et al. 2000) primerpárokat használtuk (a primerek, a PCR reakcióelegyek és az alkalmazott hőprofilok részletes ismertetését lásd: Angyal et al, 2015). A PCR termék tisztítását Roche High Pure Purification Kit, illetve Exonuclease I, és Alkaline Phosphatase (Fermentas, Germany) használatával végeztük a gyártók utasításainak megfelelően. A tisztított PCR termékek mindkét irányú szekvenálását a Molekuláris Taxonómiai Laboratórium (Magyar Természettudományi Múzeum, Budapest), illetve a MacroGen Europe (Amsterdam, Hollandia) végezte.

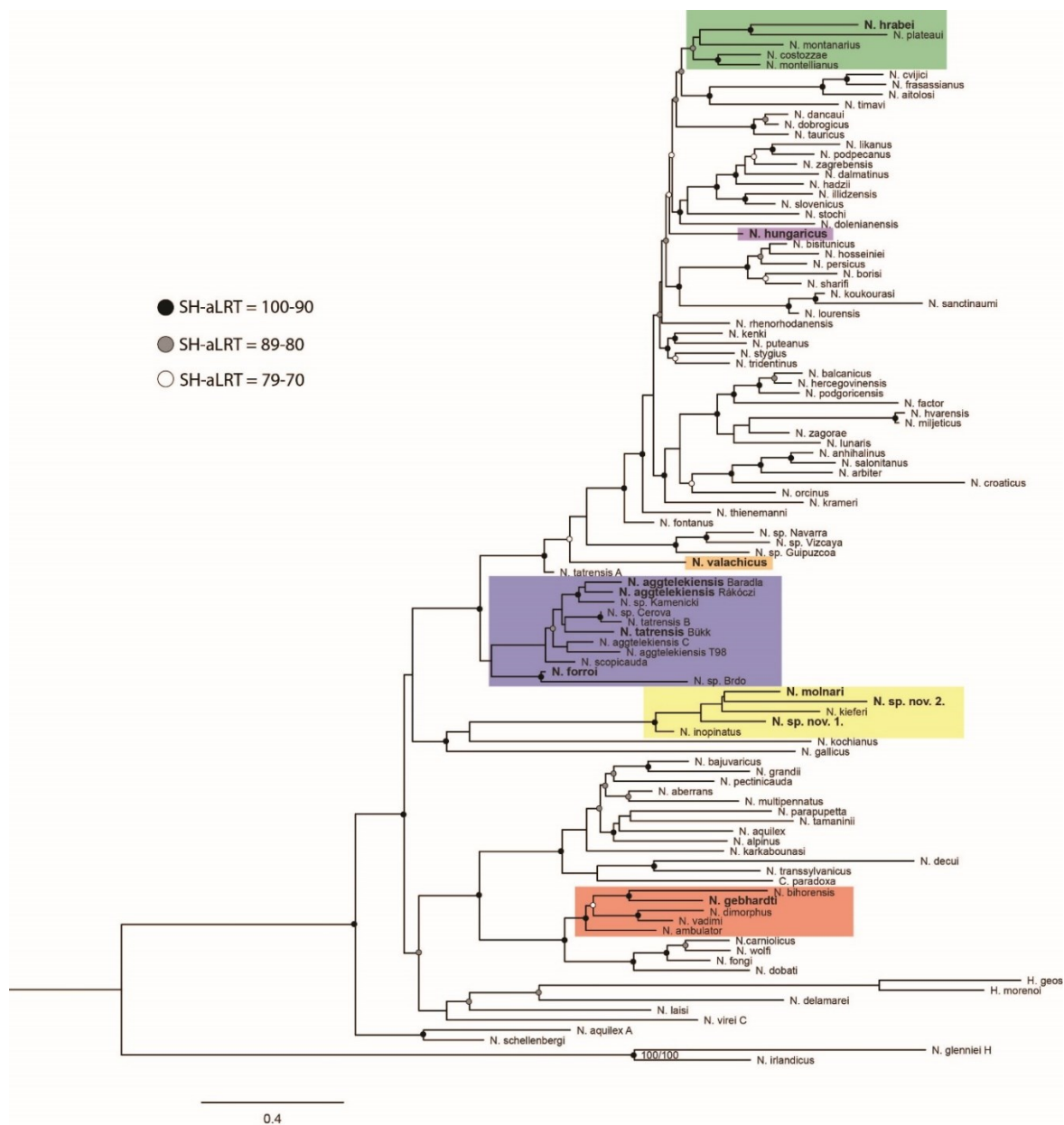
4.2.3. Adatelőkészítés és feldolgozás

A PCR szekvenciák manuális ellenőrzése, tisztítása és javítása Geneious 11.0.3. (Biomatters Ltd, New Zealand) programmal történt. A szekvenciák illesztését a MAFFT 7.388 (Katoh & Standley, 2013) programmal végeztük az E-INS-I algoritmus 1PAM/k=2 beállításával, és a legnagyobb *"gap penalty"* értékkel számolva. A legjobban illeszkedő molekuláris evolúciós modelleket a PartitionFinder 2 (Lanfear et al, 2016) programmal választottuk ki a módosított Akaike információs kritérium szerint (Hurvich & Tsai, 1989). A legmegfelelőbb szubsztitúciós modell a COI második, és harmadik fragmentum, a 28S 22 és a H3 harmadik fragmentum esetében a GTR+I+ Γ modell volt, míg a COI első, és a 28S 32 fragmentum esetében a SYM+I+ Γ került kiválasztásra, végül a H3 második fragmentum esetében a JC+I modell bizonyult a legjobbnak. A Maximum Likelihood (ML) törzsfát IQ-TREE 1.6.6 (Nguyen et al, 2015), míg a Bayes-i törzsfát MrBayes v3.2.6 (Ronquist et al., 2012) programmal készítettük. A futtatásokhoz mindkét esetben a CIPRES portált használtuk (Miller et al., 2010). A Bayes-i törzsfa készítése során a futtatást nyolc láncolattal 30 millió generációig végeztük, 3000 generációnként mintázva. Az eredmények értékelését Tracer 1.7 (Rambaut et al, 2018) programmal végeztük. A fák első 25%-ának elvetése után (*burn-in*), a maradék fákat alapul véve 50%-os többségi szabályt (*majority rule*) alkalmazva állapítottuk meg a konszenzus fát. Az ML esetében szimultán szubsztitúciós modell optimalizációt alkalmaztunk ultrafast bootstrap megközelítéssel (Minh et al., 2013). Az elágazások támogatottsági értékeit SH-aLRT (Shimodaira–Hasegawa *approximate likelihood ratio test*) módszer alkalmazásával számítottuk ki (Anisimova et al., 2011).

4.3. Eredmények

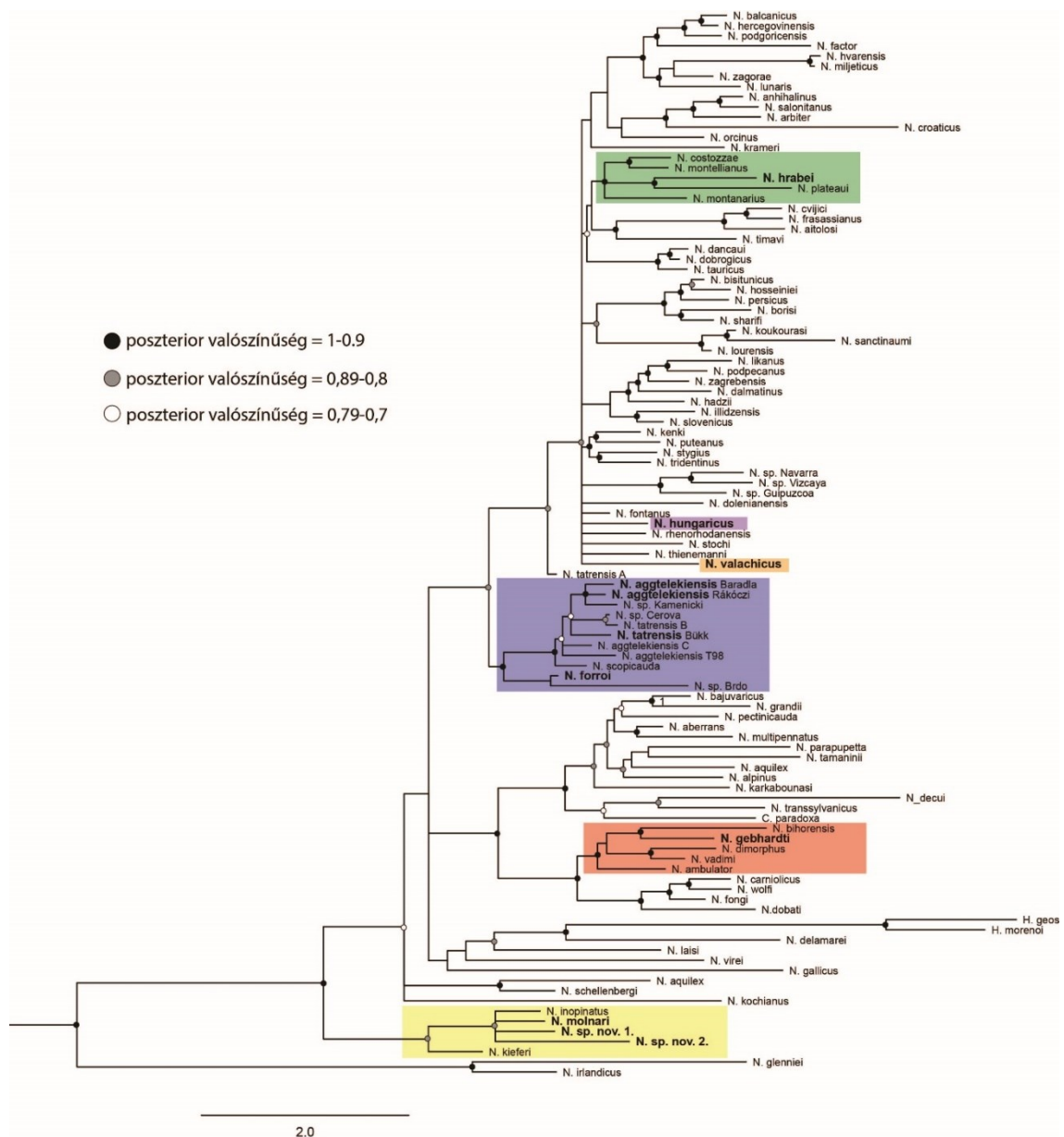
A *Niphargus* fajokat érintő genetikai vizsgálatoknál általános probléma a PCR-ok gyakori sikertelensége, mely feltehetőleg a primer kötő helyek varianciájának tudható be (Valerija Zakšek személyes közlés). Nem meglepő tehát, hogy jelen vizsgálatban is a különböző génszakaszokat változó eredményességgel sikerült felszaporítani. A törzsfakészítésbe bevont minden egyed legalább két génszakasszal szerepeltethető volt, melyek közül a H3 minden mintánál rendelkezésre állt. Mivel általános problémáról van szó, az adatbázisokból nyert szekvenciák esetében is taxononként változó számú génszakasz állt rendelkezésünkre (1. függelék). A ML (5. ábra), és a Bayesi törzsfák (6. ábra) jelentős eltéréseket mutat szerkezetében, de a hazai fajok rokonfajai igen hasonlóképpen alakulnak. Az elágazások bizonytalanságai és a fák szerkezeti eltérései mindkét módszerrel kapott törzsfák esetében feltehetőleg főképp a hiányzó szekvenciáknak köszönhetőek. Az alacsony támogatottsági értékek, és a két fán olykor teljesen más kládba kerülő fajok azt valószínűsítik, hogy a fajokként rendelkezésre álló genetikai információ mennyisége nem mutatkozott elegendőnek ennyi faj bevonásához (Som, 2014). A magyarországi fajok nagyobb kládokba történő biztos besorolása a vizsgálat alapján csak erős kétségek mellett lehetséges. Ugyanakkor a bizonytalanságok ellenére számos mintázat figyelhető meg mindkét fán azonos módon, melyek megengedik bizonyos következtetések levonását. Jól látszik, hogy a különböző hazai fajok eltérő eredetűek, esetenként jól definiálható kládok képviselői.

A *N. molnari*, a *N. sp. nov. 1.*, és a *N. sp. nov. 2.* egyértelműen rokon fajok, és egy olyan kládba tartoznak, mely viszonylag bazális elágazási pontja ellenére kevés ismert fajt foglal magába. A két felszíni faj, a *N. hrabei*, és a *N. valachicus* elhelyezkedése a *Niphargus* nemnél ritkán előforduló felszíni életmódjuk ellenére egyértelműen eltérő eredetre utal, jó összhangban a korábbi vizsgálatok eredményeivel (Copilaș-Ciocianu et al, 2017, 2018). Ellenben a *N. hrabei* nyugat-európai fajokkal való rokonsága valamelyest megkérdőjelezi a korábban feltételezett nyugat-kárpát-medencei kialakulást (Copilaș-Ciocianu et al, 2018). A *N. gebhardi* egy viszonylag jól behatárolható kládba tartozik, mely Olaszországtól a Krim-félszigetig előforduló fajokat tartalmaz.



5. ábra. Maximum Likelihood (ML) törzsfa a kulcsoport nélkül ábrázolva. A 70-nél alacsonyabb SH-aLRT értékek nincsenek megjelenítve, míg a 70-nél magasabb értékek a könnyebb átláthatóság kedvéért kategorizálva vannak ábrázolva. A hazai fajok vastagon szedve, és kládjaikkal együtt színezve jelennek meg a 7. ábra vonatkozó színezésével azonos módon.

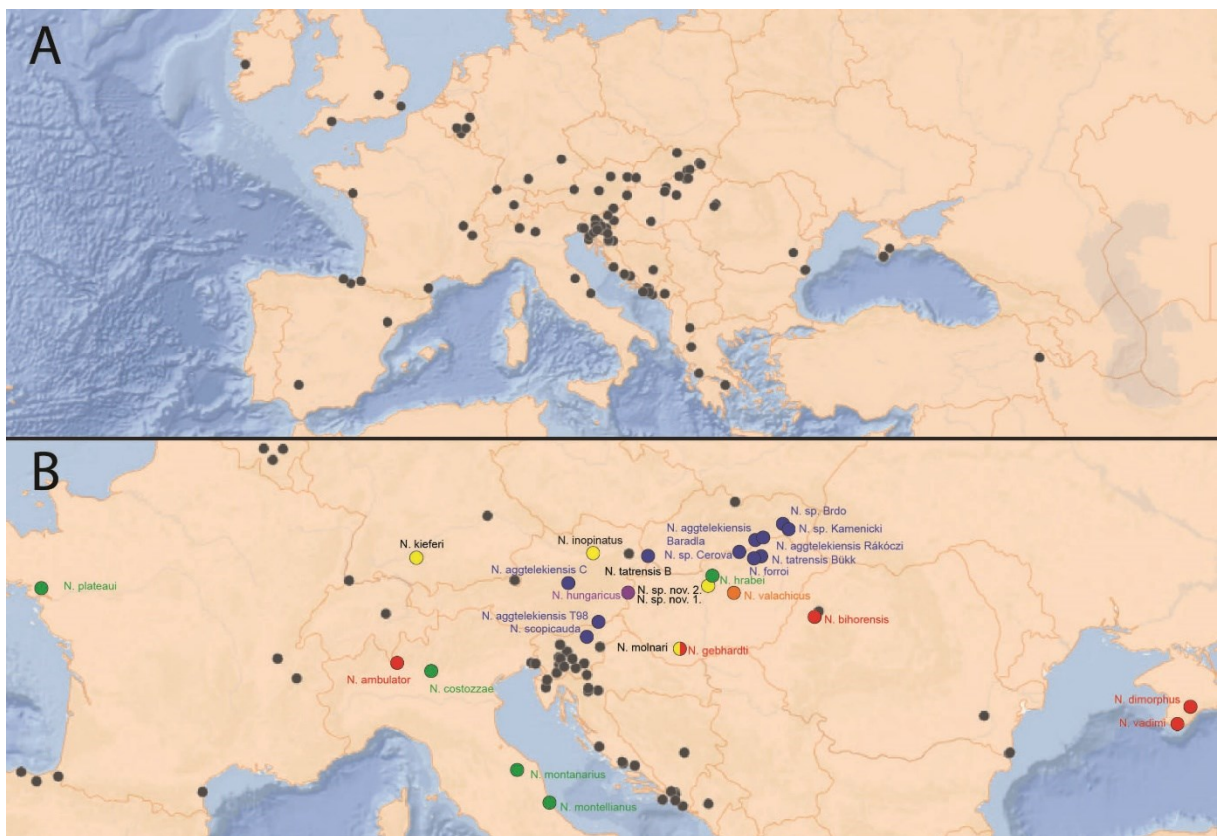
A *N. aggtelekiensis*, a hazai *N. tatrensis* és a *N. forroi* egyértelműen egy kládba tartoznak, ahol a hazai *N. aggtelekiensis* egyedek helyzete tovább erősíti a faj önálló státuszát. Mindemellett a két mintavételezési hely egyedei között feltűnő távolság mutatkozik. A *N. forroi* is egyértelmű elkülönülést mutat a kládon belül, míg a korábban a *N. tatrensis* fajhoz tartozónak gondolt morfológiai bélyegek alapján elkülönített *N. scopicauda* (Fišer et al. 2010) önálló fajként való kezelése további megerősítést nyert. A *N. tatrensis* hazai előfordulás továbbra is kétséges. A Bükk barlangjaiban élő, morfológiai bélyegek alapján meghatározott egyed nem egyértelműen sorolható be a többi *N. tatrensis* fajként azonosított egyed közé. Különösen igaz ez, ha figyelembe vesszük, hogy a „*N. tatrensis* A”-ként szereplő egyed származik a típuslelőhely közeléből. A utóbbi minta kládon kívüli elhelyezkedése a bizonytalanságok ellenére is jól jelzi azt a lehetőséget, mely szerint esetleg nem csak a magyarországi populációk nem tartoznak a fajhoz, de számos más, az Északi- és a Nyugati-Kárpátokból származó minta sem sorolható genetikai alapon a törzsalakhoz. Az eredmények alapján egy számos kriptikus fajból álló fajkomplex képe rajzolódik ki. Jelen vizsgálat eredményei nem teszik lehetővé a *N. hungaricus* rokonsági viszonyainak tisztázását. Elképzelhető, hogy bizonytalan elhelyezkedése nem karsztos élőhelyének köszönhető. A nem karsztos szubterrán élőhelyek vizsgálata egész Európában jelentős hiányosságokat mutat, de hazánkban és főleg Európa tőlünk keletebbre eső területein ilyen vizsgálatok eddig csak elvétve zajlottak, így jó eséllyel nem ismertek a *N. hungaricus* rokon fajai. Az ilyenformán önkéntelenül létrejött elégtelen mintavételezés jelentősen befolyásolhatja a filogenetikai vizsgálatok eredményeit, alacsony támogatottságú és politómikus elágazásokat eredményezve (Heath et al., 2008).



6. ábra. Bayes-i törzsfá a külcsoporthoz képest ábrázolva. A 0,7-nél alacsonyabb poszterior valószínűségi értékek nincsenek megjelenítve, míg a 0,7-nél magasabb értékek a könnyebb átláthatóság kedvéért kategorizálva vannak ábrázolva. A hazai fajok vastagon szedve, és kládjaikkal együtt színezve jelennek meg a 7. ábra vonatkozó színezésével azonos módon.

4.4. Diskusszió

A hazai fajokat magukba foglaló különböző kládok elhelyezkedése a törzsfán bizonytalan, és ebben a tekintetben több esetben jelentős eltérést mutatkozik a két törzsfá között (5. és 6. ábra). Ennek fényében sajnos a hazai fajok nem belüli valódi elhelyezkedéséről nem kapunk megbízható képet. A hazai fajokkal rendelkező kládok fajösszetétele viszont elfogadható támogatottsági értékekkel rendelkezik, és igen hasonló a ML, és a Bayes-i törzsfákon. Természetesen sem a vizsgálati módszerek, sem a kapott eredmények nem teszik lehetővé messzemenő következtetések levonását a vizsgált fajok filogeográfiájára vonatkozóan, de mindenképpen fontos kiindulási pontjai lehetnek további célzott kutatásoknak.



7. ábra. A törzsfakészítéshez felhasznált taxonok földrajzi elhelyezkedése: A) az összes minta megjelenítése; B) a hazai fajok, és a velük egy kládba tartozó taxonok megjelenítése a törzsfákon alkalmazott színezéssel.

A *N. molnari*, a *N. sp. nov.* 1. és a *N. sp. nov.* fajokat tartalmazó kládba két másik faj található. A *N. kieferi* SCHELLENBERG, 1936 egy széles elterjedésű, Németországban és Franciaországban honos talajvizekben élő faj, míg a *N. inopinatus* SCHELLENBERG, 1932 szintén nem karsztos élőhelyeken fordul elő Németországtól egészen Szlovákiáig (Hudec & Mock, 2014) (7. ábra). A klád bazális elválása, különösen a Bayes-i törzsfán (6. ábra) és a három hazai faj élőhelye alapján feltételezhetjük, hogy ezek ősi fajok, és mind a Mecsek barlangjai, mind a Budai-termálkarszt refúgiumként működött, mit ahogyan azt korábban más kutatások is valószínűsítették (Angyal et al., 2015, Pérez-Moreno & Balázs et al., 2017).

A *N. hrabei* legközelebbi rokonának a széles elterjedésű franciaországi *N. plateaui* CHEVREUX, 1901 mutatkozott. Ez az eredmény nemcsak mindkét fán azonos és egyértelmű, de teljesen megegyezik a korábbi elképzelésekkel (Copilaş-Ciocianu et al., 2018). A kládban ezen kívül három fajt találunk (*N. costozzae* SCHELLENBERG, 1935, *N. montanarius* G. KARAMAN, 2010, *N. montellianus* STOCH, 1998), melyek mind az Appennini-félszigeten fordulnak elő (7. ábra). A mintázat alapján valószínűsíthető, hogy egy mediterrán refúgiumból való nyugat-keleti terjeszkedés eredményeképpen alakult ki a *N. hrabei* és a *N. plateaui*. Ezt a feltételezést erősíti, hogy a klád testvérkládja kivétel nélkül klasszikus mediterrán refúgiumterületeken élő fajokból áll (*N. cvijici* S. KARMAN, 1950, *N. frasassianus* G. KARAMAN, 2010, *N. aitulosi* NTAKIS, 2015, *N. timavi* S. KARMAN, 1954).

A *N. valachicus* nem tartozik jól behatárolható kládba, így eredetéről szinte semmilyen információt nem tudunk. Érdeemes megjegyezni azonban, hogy egy korábbi vizsgálatban gyenge támogatottsággal ugyan, de rokonságot mutatott több olaszországi fajjal is (Copilaş-Ciocianu et al., 2018). Ezt a rokonságot jelen vizsgálat eredményeiből annak ellenére sem lehetett kimutatni, hogy az ott rokonként megjelenő fajok közül kettő, a *N. dolenianensis* LORENZI, 1898 és a *N. krameri* SCHELLENBERG, 1935, szerepelnek a vizsgálatban. Ez a két faj mind az ML, mind a Bayes-i törzsfán máshol helyezkedik el, de egyik esetben sem mutat közeli rokonságot a *N. valachicus* fajjal.

A *N. gebhardti* egy jól elkülönülő kládot alkot krim-félszigeti (*N. dimorphus* BIRSTEIN, 1961, *N. vadimi* BIRSTEIN, 1961), romániai (*N. bihorensis* SCHELLENBERG, 1940), és olasz (*N. ambulator* G. KARAMAN, 1975) fajokkal (7. ábra). A klád elég nagy, hasonló szélességi fokon (44° - 46°) maradó elterjedést mutat, míg a hozzá legközelebb álló testvérklád

tagjai kivétel nélkül szlovéniai fajok (*N. carniolicus* SKET, 1960, *N. wolfi* SCHELLENBERG, 1933, *N. fongi* FIŠER & ZAGMAJSTER, 2009, *N. dobati* SKET, 1999) (5. és 6. ábra). Mivel a többi, elemzésbe bevont kelet-európai faj más kládokba tartozik, feltételezhetjük, hogy a *N. gebhardti* fajt magába foglaló klád valahonnan a Dinári-hegység északi részéből eredhet.

A *N. aggtelekiensis* és *N. tatrensis* fajoknak beazonosított taxonokat magába foglaló klád komoly bizonytalanságokat jelenít meg (5. és 6. ábra), de tagjai kivétel nélkül a Nyugati- és az Északi-Kárpátok területén fordulnak elő (7. ábra). A hazai *N. aggtelekiensis* populációk jól elkülönülnek a többi taxontól, de az elenyésző földrajzi távolság (15 km) ellenére egymástól is jelentős genetikai távolságra vannak (16% eltérés a COI esetében), mely távolság nagyságrendjében a *Niphargus* nemre általában jellemző fajok közötti távolságnak felelne meg. A bevont ausztriai *N. aggtelekiensis* populációk („*N. aggtelekiensis* C”, „*N. aggtelekiensis* T98”) egyértelműen elkülönülnek a hazai populációktól, és külön fajként kellene kezelni őket. A szlovéniai előfordulású *N. scopicauda* törzsfákon elfoglalt helyzete nem meglepő, és teljesen összhangban van a korábbi, morfológiai alapokon nyugvó önálló faji státuszba emelésével (Fišer et al. 2010). A bükki *N. tatrensis* minta elhelyezkedése alapján nehéz következtetéseket levonni a faj hazai előfordulását illetően. Bár közeli rokonságot mutat más *N. tatrensis* egyedként meghatározott mintákkal, a típuselőhelyhez legközelebbi mintától jelentős elkülönülést mutat. Amennyiben a hazai és ausztriai *N. aggtelekiensis* populációkat külön fajnak tekintjük, akkor a bükki populációt is jó eséllyel külön fajként kellene kezelni. A *N. tatrensis* csoportba (lásd: Fišer et al., 2010) sorolt populációk és fajok (ide értve a *N. aggtelekiensis* és *N. scopicauda* fajokat) taxonómiai helyzetének megnyugtató tisztázása jelen vizsgálat kereteit biztosan meghaladja. A szintén a kládba tartozó *N. forroi* helyzete sokkal jobban értelmezhető, mivel az elkülönülés egyértelmű és morfológiai különbségekkel is jól alátámasztható (Karman G. S., 1986).

A *N. hungaricus* rokonsági viszonyai az eredmények alapján egyáltalán nem tisztázhatóak még hozzávetőlegesen sem. Sem a ML, sem a Bayes-i törzsfá nem mutat megbízható elhelyezkedést, és közelrokon fajokat.

Az egyes földrajzi egységek *Niphargus* fajainak tekintetében elmondható, hogy a Mecsek barlangjaiban előforduló *N. molnári* és *N. gebhardti* fajok más fejlődési ágakból származnak és együttes előfordulásuk külön kolonizációk eredménye, melyek

időbeliségéről azonban nem áll rendelkezésünkre információ. Az Északi-középhegység barlangjaiban előforduló taxonok közül a *N. aggtelekiensis* és *N. tatrensis* fajok egy recens expanzió, és az azt követő allopatrikus fajkeletkezések lehetőségét vetik fel, míg a *N. forroi* esetében nem zárható ki a szimpatikus fajkeletkezés sem, azzal a kitételrel hogy az nem feltétlen a faj mai elterjedési területén zajlott le. A Molnár János-barlangban élő fajok közül a *N. hrabei* jelenléte biztosan egy recens kolonizáció eredménye (Pérez-Moreno & Balázs et al., 2017), míg a biztosan régebb óta jelen lévő *N. sp. nov. 1.* és *N. sp. nov. 2* esetében egyaránt elképzelhető a szimpatikus és az allopatrikus fajkeletkezés is.

A vizsgálat eredményeképpen létrehozott törzsfákra jellemzőek az elágazásokhoz rendelt alacsony támogatottsági értékek. Az alacsony támogatottságú elágazások számos okra vezethetők vissza. Általánosságban elterjedt gyakorlat, hogy a vizsgálatba bevont génszakaszok számának növelésével jobb képet alkothatunk a leszármazási viszonyokról. Ez azonban egyáltalán nem igaz abban az esetben, ha az általunk vizsgált génszakaszok eltérő filogenetikával rendelkeznek, hiszen ekkor éppen ellentétes hatást érünk el a vizsgált génszakaszok számának növelésével (Philippe et al., 2009). Különösen igaz ez abban az esetben, ha sok taxont vizsgálunk, mert ilyenkor megnövekszik az esélye az eltérő filogenetikai háttér zavaró hatásának (Philippe et al., 2011). A génszakaszok számának további növelésével ez a hiba valamennyire kiküszöbölhető, de ez azzal járhat, hogy megnövekszik a nem filogenetikus információ az elemzésben, melynek eredményeképpen jó támogatottságú, de a valóságot nem tükröző fákat kaphatunk (Philips et al., 2004). Jelen vizsgálat esetében feltehetőleg messze jártunk az optimális génszakasz számtól, vagy azok kiválasztása nem volt megfelelő. Sajnálatos módon azonban a saját minták esetében a vizsgálandó génszakaszok változtatására, vagy számának növelésére nem volt lehetőség, hiszen ezek kijelölését alapvetően az összehasonlításhoz elengedhetetlen, más forrásokból hozzáférhető szekvenciák határozták meg. Feltehetőleg az adott génszakaszokkal is jobb eredményt lehetett volna elérni a mintavételezési frekvencia egyenletesebbé tételével, hiszen ez bizonyítottan jelentősen javíthatja a törzsfák megbízhatóságát (Heath et al., 2008; Nabhan & Sarkar, 2011), ez azonban a feltáratlan szubterrán élőhelyek miatt ebben az esetben nem volt kivitelezhető.

5. A Molnár János-barlang faunájának ismertetése, és a barlangban élő *Niphargus hrabei* és *Asellus aquaticus* populációk kolonizációjának és adaptációjának vizsgálata molekuláris genetikai módszerekkel

Pérez-Moreno, J. L.*, Balázs, G.*, Wilkins, B., Herczeg, G. & Bracken-Grissom, H.D. (2017). The role of isolation on contrasting phylogeographic patterns in two cave crustaceans. BMC Evolutionary Biology, 17, 247.

*megosztott elsőszerszőség

Pérez-Moreno, J. L., Balázs, G. & Bracken-Grissom, H. D. (2018). Transcriptomic and epigenetic insights into the evolution of vision loss in cave-dwelling crustaceans. Integrative and Comparative Biology 58(3), 452-64.

5.1. A téma ismertetése

5.1.1. A Molnár János-barlang, és makroszkopikus faunája

A Budai-termálkarszt (BTK) területén elhelyezkedő Molnár János-barlang az egyetlen ismert, jelenleg is aktívan képződő barlang a Rózsadomb számos barlangja közül (Leél-Össy, 2017). A terület barlangjainak kialakulása bizonyítottan a feláramló különböző hőmérsékletű, és iontartalmú meleg vizek keveredési korróziójának köszönhető (pl. Kovács & Müller, 1980), így tehát ezek a hipogén termálkarsztos barlangok (Klimchouk, 2007, Erőss, 2010). A legújabb elgondolások szerint a térség járatainak kialakulása a tektonikus perforáltság mentén feláramló és a Duna-menti megcsapolási pontokhoz közel eső területeken keveredő különböző vizek korróziós hatásának, és kisebb mértékben a bakteriális aktivitással segített kénsavas oldódásnak tudható be (Borsodi et al., 2012, Anda et al., 2015). A keveredési zónákban a meteorikus és a Pannon medence kivékonyodott kérgéhez köthető hőfluxus miatt felmelegedett vizek találkoznak (Poros et al., 2012). A Rózsadomb felső régióiban elhelyezkedő barlangok a térszintemelkedés miatt mára szárazzá váltak és bennük az epigén hatásoknak köszönhetően a kiválási folyamatok kerültek előtérbe, míg a Molnár János-barlang

esetében jelenleg is az oldódási, járatképződési folyamatok túlsúlya figyelhető meg (Ford, 1995; Leél-Össy et al., 2011). A Molnár János-barlang jelenleg több mint 7 km feltárt vízalatti járatrendszerrel rendelkezik, a legmélyebb ismert pontja 100 méter mélyen van. A hálózatos szerkezetű, többszintes járatok és termek többnyire nagy méretűek. A barlangban található vizek hőmérséklete 17 °C és 27 °C között változik igen komplex rendszert alkotva, de általánosságban megfigyelhető, hogy a felsőbb régiók, kb. 11 méteres vízmélységig melegebbek, míg egyértelmű határvonallal az ennél mélyebb részekben hidegebb vizeket találunk. A barlangi vizek keveredve több forráson keresztül a barlang bejáratánál található Malom-tóba ömlenek, ahonnan egy mesterséges földalatti csatorna vezeti el a felesleges vizet a Dunáig.

A Molnár János-barlang korát mindössze néhány tízezer évre teszik (Leél-Össy et al., 2011), biológiai szempontból azonban nem egy adott barlang kora a meghatározó, hanem sokkal inkább a területen található egykor hasonló életkörülményeket kínáló barlangok kialakulásának kezdete. Ahhoz, hogy erre a fontos kérdésre akár csak megközelítő választ kapjunk, sorra kell venni a kialakulás feltételezett lépéseit és azok vonatkozó korolását. A BTK területén található kiterjedt barlangrendszerek kialakulása a jelenleg elfogadott álláspont szerint egy kétfázisú folyamat volt (Kovács & Müller; 1980, Virág 2016). A feltehetőleg a miocénben lezajlott első, úgynevezett feszített tükrű fázis során a karsztfelszín fedett volt, és így a feláramló vizek magas nyomáson, és hőmérsékleten maradtak. Ebben a fázisban keveredési korrózió és jelentős üregképződés nem történt, de a tektonikus hasadékokban létrejött ma is megfigyelhető kalcit és barit telérek ekkor keletkeztek. A tektonikus hasadékokat egykor kitöltő víz hőfokára igen eltérő becslések vannak, de mindegyik feltételezett hőmérséklet jóval magasabb (Virág, 2016), mint az felsőbbrendű élőlények számára tolerálható lenne. A második fázisban a karsztfelszín nyílttá vált, és ez lehetővé tette a felszíni eredetű vizek lejutását a mélyebb régiókba, különböző utat bejáró és így eltérő fizikai, és kémiai paraméterekkel rendelkező vizeket eredményezve, mely maga után vonta a keveredési korrózió megjelenését a kilépési pontok közelében. A második fázis kezdetének datálása elég nehéz feladat. A legtöbb szakember szerint a jelentősebb üregesedés kezdete a pliocén-pleisztocén határára tehető (Virág, 2016), mert a feltételezések szerint a lepusztulás ekkor már részben elérte a karbonátos kőzetet. Azonban a területen található egykori hidrotermás forrásokat jelölő mészkiválások, az úgynevezett

travertinók datálása során a legrégebbi ismert, biztosan forrástevékenységhez köthető travertinó középső pleisztocén korúnak bizonyult (Kele, 2009; Kele et al., 2009, 2011). Ez jelen esetben azért fontos, mert a travertinók kialakulásának intenzitása a fedett karszt és a nyílt karszt közötti átmenethez köthető (Klimchouk, 2007). Ennek alapján feltételezhetjük, hogy a középső-plicénben a lepusztulás és ezzel a nyílt tükrű fázis megjelenése még nem volt teljes. Egy másik vizsgálati megközelítés a mára szárazra került barlangokban található barlangi tutajok korát határozta meg a kiemelkedési események időbeliségének tisztázására végzett kutatás keretében. A barlangi tutajok vízfelszínen kiváló kalcitlemezek, amelyek csak akkor jöhetnek létre, ha az adott barlangjárat már nincsen teljesen kitöltve vízzel, tehát mindenképpen a járat keletkezése utáni időszakot jelölik. A Szemlő-hegyi-barlangban, a Pál-völgyi-barlangban és a József-hegyi-barlangban gyűjtött minták alapján a legrégebbi barlangi tutajok kora több, mint 450 ezer év (Szanyi et al., 2012). Mindezek alapján azt mondhatjuk, hogy egyrészt a BTK nagy kiterjedésű barlangjainak megjelenése nem valószínű a középső-pleisztocén (1,5 millió év) előtt, másrészt viszont 500 ezer évvel ezelőtt már biztosan voltak a Molnár János-barlanghoz hasonló életfeltételeket kínáló nagy járatrendszerek a területen.

A Molnár János-barlang makroszkopikus élővilágának kutatása a jelentős feltárási aktivitás, és a komoly geológiai vizsgálatok ellenére csak igen későn, 2012-ben kezdődött meg. A kutatásokban ezt megelőzően nem vett aktívan részt biológus, és a merülések során nagyritkán megfigyelt vakrákokat szaktudás hiányában a bűvárok rendre a Malom-tóból leírt *N. thermalis* faj egyedeinek hitték. A hazai *Niphargus* fajok taxonómiai revíziójához kapcsolódóan 2012-ben gyűjtést végeztünk a barlang Kessler Hubert termében, melynek során *N. hrabei* (*N. thermalis*) egyedeket ugyan nem sikerült gyűjteni, de egy addig ismeretlen *Niphargus* faj egyedei kerültek elő. A 2013-tól, 2015-ig végzett gyűjtések eredményeképpen a barlangban megtaláltuk a *N. hrabei* faj egyedeit, egy újabb ismeretlen *Niphargus* fajt, az *Asellus aquaticus* eutroglóbiont populációját, valamint egy a *Bythiospeum* nemhez tartozó csigafaj egyedeit. A felsorolt fajok előfordulása a barlang különböző szakaszain nem egyenletes.

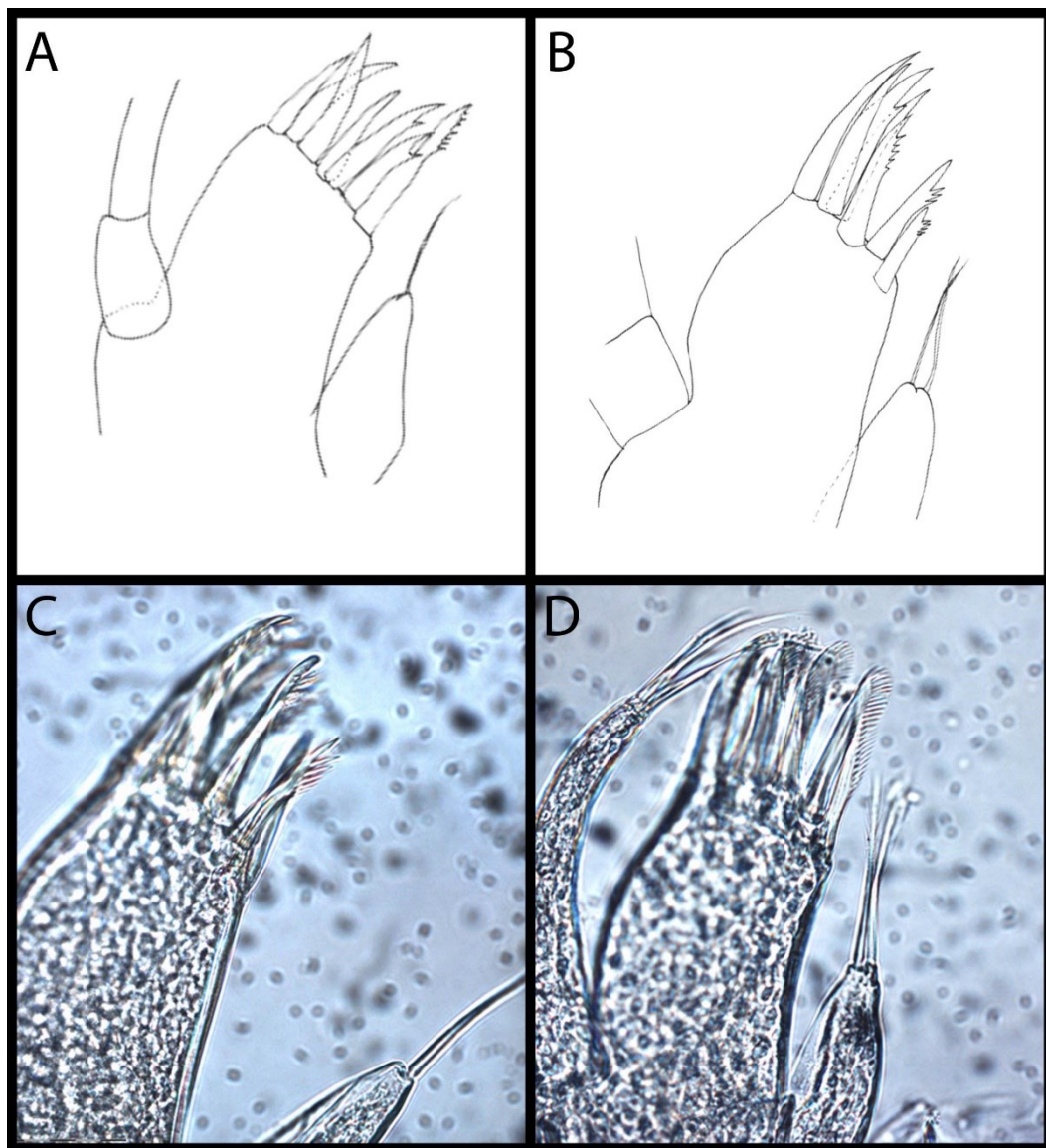
A két új *Niphargus* faj (8. ábra A, B) a barlang legtöbb járatában változó sűrűségben fellelhető, míg a többi faj egyedei a megfigyelések szerint majdnem kizárólag a keveredési zónákban fordulnak elő. A legnagyobb egyedsűrűséget minden faj esetében a keveredési zónákban találjuk, a 11 méteres vízmélységet keresztező járatokban.



8. ábra. A) *N. sp. nov. 1.* és B) *N. sp. nov. 2.* a Molnár János-barlangban (Fotók: Balázs Gergely).

A Molnár János-barlangban az elhanyagolható felszíni hatás és hipogén vízáramlás miatt (Leél-Össy et al., 2011) a felszínről feltételezhetően nem jut be tápanyag. Ezt támasztja alá, hogy a barlangban vett vízmintákban mért teljes szerves szén (*total organic carbon*, TOC) mennyisége igen alacsony, 1,4 mg/l-es értéket mutat (Dobossy et al., 2016). A barlangi ökoszisztéma energiaforgalma nem bizonyítottan, de feltételezhetően kemoautotóf baktériumok által termelt szerves anyagokon alapul. A bakteriológiai vizsgálatok eredményei is ebbe az irányba mutatnak, mivel számos, a kemoautotróf

életközösségekre jellemző baktérium jelen van a falakon és az üledéken lévő biofilmben (Borsodi et al., 2012). Ennek megfelelően a barlangban sehol nem találunk az epigén karsztrendszerekben megfigyelhető, szabad szemmel érzékelhető szerves üledéket. Az itt élő felsőbbrendű élőlények, függetlenül a kemoautotrófia szervesanyag termelésben betöltött arányától feltehetőleg mikroszkopikus méretű táplálékot fogyasztanak. A két új *Niphargus* esetében a felvett morfológiai adatok alapján kisméretű táplálékszemcsék fogyasztására alkalmas szájszerveket figyelhetünk meg. A *Niphargusok* különböző testtájain található serteszám általában pozitív összefüggésben van az adott faj testméretével, azzal kitétellel, hogy ezen felül is nagy egyedi változatosságot mutat (Fišer et al., 2009). A *N. sp. nov. 1.* 6-8 mm-es, és az *N. sp. nov. 2.* 4-6 mm-es testhosszával egyaránt kisméretű fajnak tekinthető. Ennek ellenére a szájszerv összes képlete feltűnően sok sertével rendelkezik. A sertézettség bizonytalan megítélése mellett azonban van egy jóval egyértelműbb, és sokkal konzervatívabb bélyeg, ez pedig a *maxilla* I. külső lebenyének végén található hét tüske felépítése. A legtöbb *Niphargus* faj esetében a tüskék közül legfeljebb az első 3-4 tüske rendelkezik oldalnyúlványokkal, mint ahogy az jellemző például a hasonló mérettartományba eső *N. molnari* és *N. gebhardti* fajokra (9. ábra A, B). Ezzel szemben a *N. sp. nov. 1.* esetében az első tüske 10-12, míg minden további tüske 3-5 oldalnyúlvánnyal rendelkezik (9. ábra C). Az *N. sp. nov. 2.* esetében a belső lebeny tüskéi még specializáltabbnak bizonyulnak, tekintve hogy minden tüske legalább 20 oldalnyúlvánnyal rendelkezik (9. ábra D). Az ilyen tüskefelépítés általában azokra a fajokra jellemző melyek, vagy intersticiális élőhelyen fordulnak elő, mint például a *Niphargus hebereri* SCHELLENBERG, 1933, vagy kemoautotróf életközösségek tagjai, mint a *Niphargus ictus* KARAMAN. G. 1985, vagy a *Niphargus stefanelli* RUFFO & VIGNA-TAGLIANTI, 1968.



9. ábra. A *maxilla* I. tüskéinek szerkezete különböző fajoknál: A) *N. molnari* (Angyal et al., 2015 nyomán); B) *N. gebhardti* (Angyal et al., 2015 nyomán); C) *N. sp. nov. 1.*; D) *N. sp. nov. 2.* (Fotók: Balázs Gergely).

A barlangban előforduló csigafaj, a *Bythiospeum sp.* (10. ábra) beazonosítása nehéz feladat. A genus fajai jellemzően szubterrán élőhelyeken előfordulnak elő, és apró méretük (1-3 mm) mellett morfológiailag nagyon hasonlóak. A legújabb, genetikai vizsgálatokon alapuló kutatások eredményeit figyelembe véve a taxon revízió alatt áll (Richling et al., 2017). A Molnár János-barlangban gyűjtött egyedek morfológiai vizsgálata még várat magára, de genetikai vizsgálatukat megkezdjük. A Citokróm-oxidáz I. alegység vizsgálatához a DNS kivonást DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen)

használatával végeztük a gyártó előírásainak megfelelően. A polimeráz láncreakcióhoz (PCR) a HCO2198 (5'-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3') és LCO1490 (5'-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3') primerpárt használtuk (Folmer et al., 1994). A PCR reakciókat 25 µl végtérfogatban végeztük 5 µl templát DNS-t, 0.2 mM dNTP-t (Thermo Scientific), 1 U DreamTaq DNS polimerázt (Thermo Scientific), 1× DreamTaq buffert (Thermo Scientific), 0.325 µM primert és 10 µg BSA-t (Thermo Scientific) felhasználva. A hőprofil a következő volt: 5 perces 96°C-on történő denaturálás után 35 cikluson keresztül 1 perc 40°C-on, majd 1,5 perc 72°C-on, majd 1 perc 94°C-on majd lezáró lépésként 10 perc 72°C-on. A reakció sikerességét GR Safe DNA Stain (Innovita) festékkel festett 1 w/v %-os agaróz gélen elektroforetizálva UV-megvilágítás alatt ellenőriztük. A PCR termék tisztítását, és szekvenálását a LGC Genomics GmbH (Berlin, Germany) végezte. A kromatogramok ellenőrzését, javítását és a primer szakaszok eltávolítását a Chromas v 1.45 (Technelysium) programmal végeztük. A kapott 635 bázispár hosszúságú szakaszt az adatbázisokban fellelhető szekvenciákkal homológ szekvencia kereső algoritmussal (BLAST) hasonlítottuk össze. A kapott eredmények azt mutatják, hogy a barlangban fellelhető egyedek több, mint 99%-os egyezést mutatnak több, az Alpok északi lábánál, Németországban előforduló fajjal. A legutóbbi átfogó, *Bythiospeum* fajokkal foglalkozó vizsgálat szerint (Richling et al., 2017) az egyezést mutató fajok mindegyike, a szerzők által Clade I.-ként feltüntetett monofiletikus csoportba tartozik, melynek tagjai az eltérő fajnevek ellenére nem mutatnak számottevő genetikai különbséget a COI génszakaszban. A Clade I. vizsgálatba bevont, legrégebben leírt faja, a *Bythiospeum acicula* (HELD, 1838) 99,69%-os egyezést mutat a Molnár János-barlangban élő egyedekkel, így tehát ez a helyes megnevezés. Jól szemlélteti a *Bythiospeum* fajok bizonytalan taxonómiai helyzetét, hogy a szerzők a jelzett publikációban 58, a genetikai vizsgálat előtt validnak tekintett fajt sorolnak fel, mint lehetséges *B. acicula* szinonimákat. A faj elterjedése a Molnár János-barlangban található populációval meglehetősen diszjunkt. A szubterrán fajokra általánosságban jellemző a kis elterjedési terület (Trontelj et al., 2009), de az intersticiális élőhelyek feltehetőleg jelentősen megnövelik a diszperzió lehetőségét, így elképzelhető, hogy a diszjunkt elterjedési mintázat az elégtelen mintavételezésre utal, és nem a valódi mintázatot mutatja meg. A kérdés tisztázására irányuló jövőbeli vizsgálatokba mindenképp érdemes lenne bevonni a Szigetköz rétegvizeiből ismert *Bythiospeum*

oshanovae (L. PINTÉR, 1968) fajt, mely földrajzi helyzetéből fakadóan fontos eleme lehet a filogeográfia helyzet megértésének.



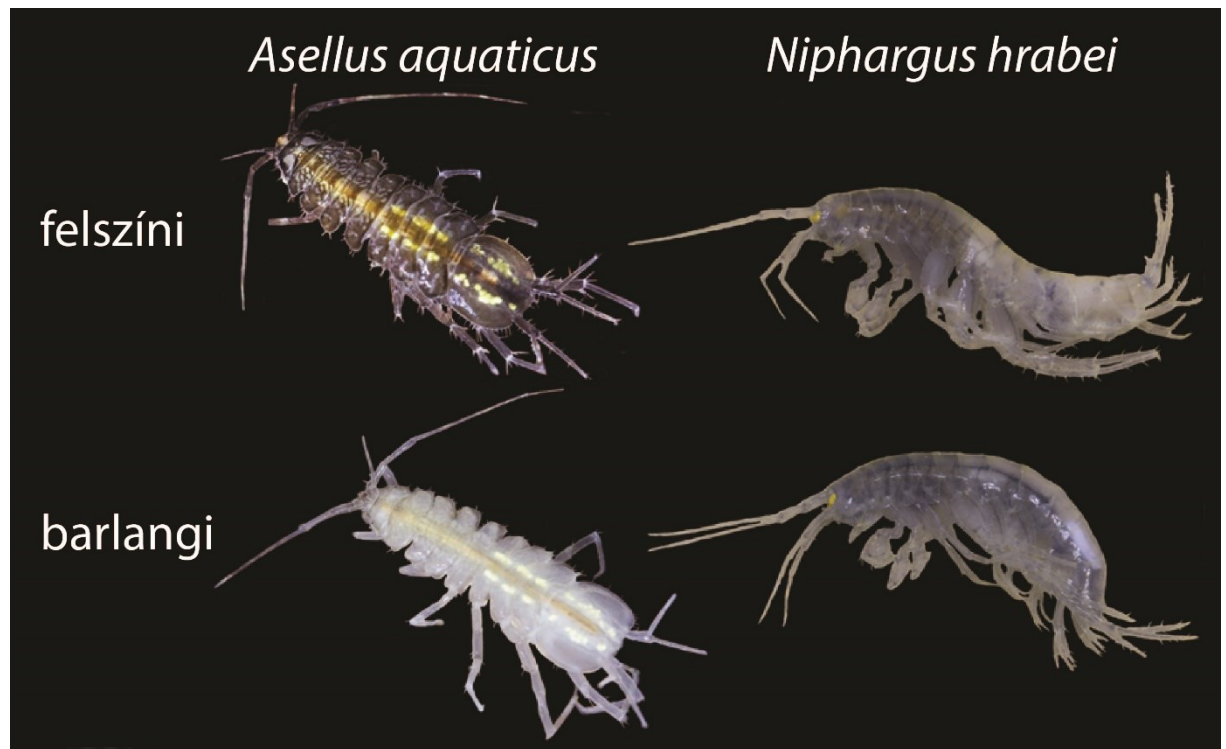
10. ábra. *Bythiospeum acicula* a Molnár János-barlangban (Fotó: Balázs Gergely).

A barlangban és annak forrástavában, a Malom-tóban egyaránt előforduló *N. hrabei* egy széles körben elterjedt, alapvetően felszíni vizekben előforduló vakbolharák faj. A populációgenetikai vizsgálatok alapján az egymástól nagy földrajzi távolságokban élő populációk közötti kis genetikai eltérésre alapozva Copilaș-Ciocianu és munkatársai (2017, 2018) azt a következtetést vonták le, hogy a faj igen gyors recens area expansiót mutat. Jelenleg 15 olyan *Niphargus* fajt ismerünk, amelyek felszíni vizekben, vagy felszíni vizekben is előfordulnak (Copilaș-Ciocianu, 2018). Ez a szám összevetve a több, mint 400 ismert *Niphargus* fajjal elenyészőnek mondható. Amennyiben figyelembe vesszük azt is, hogy ezek a felszíni fajok külön fejlődési ágakon, egymástól függetlenül jelennek meg a genusz törzsfáján (Copilaș-Ciocianu et al., 2018), akkor egyértelműen kijelenthetjük, hogy a *N. hrabei* esetében egy alapvetően szubterrán genusz felszíni fajáról van szó (11.

ábra). Ez azért érdekes helyzet, mert ez esetben a Molnár János-barlangban élő populáció másodlagosan tért vissza a szubterrán élőhelyhez, ami lehetővé teszi az exaptáció kolonizációban betöltött szerepének vizsgálatát. A faj egyedei a barlangban mindig megtalálhatóak, de egyedszámuk jóval elmarad a többi *Niphargus* fajtától.

A barlangban szintén megtalálható a közönséges víziászka (*Asellus aquaticus*, (LINNAEUS, 1758)) stabil barlangi populációja. Az *A. aquaticus* (Isopoda, Asellidae), egy Európában széles körben elterjedt, felszíni vizekben élő ászkafaj, amely számos eltérő feltételeket kínáló élőhelyen megtalálható. A faj igen nagy toleranciát mutat a hőmérsékletre (diLascio et al., 2011), a szennyező anyagok jelenlétére (e. g. Mullis et al., 1994) és az elérhető táplálékforrásokra egyaránt (Marcus et al., 1978, Zimmer & Bartholomé, 2012). A filogenetikai vizsgálatok alapján az ázsiai eredetű faj körül-belül 8-12 millió éve jelent meg Európában (Verovnik et al., 2005), és mintegy 4-8 millió éve a Pannon-medence nyugati részéről kiindulva kezdett terjeszkedésbe (Sworobowicz et al., 2015). Az *A. aquaticus* elsősorban a lassan áramló édesvizeket kedveli, de megtalálható álló-, és brakkvizekben is (Gruner, 1965). Ezzel szemben a magas sótartalmú vizet nem éli túl és a gyorsan áramló oligotróf vizeket is kerüli. Ennek köszönhető, hogy bár Európa majdnem teljes területén előfordul, néhány földközi-tengeri szigetről (Sket, 1994) és a Pireneusok hegylánca által határolt Ibériai-félszigetről hiányzik (Verovnik et al., 2005). A faj egymástól időben és térben elkülönülten több alkalommal sikerrel kolonizált barlangi élőhelyeket (Prevorčnik et al., 2004, Verovnik et al., 2004, Konec et al., 2015). Magyarországon a Molnár János-barlang mellett egyedül a Tapolcai-tavas-barlangból (Balaton-felvidék) van adat feltételezhetően barlangi populációról (Geyer & Mann, 1940). A Tapolcai-tavas-barlang, köszönhetően a bauxit bányászat miatti jelentős karsztvízszint csökkentésnek, a 80-as években átmenetileg szárazzá vált. A jelzett populációt az intenzív terepi munka ellenére nem sikerült megtalálnom, így feltételezhetjük, hogy az átmeneti kedvezőtlen körülmények miatt kipusztult. A Molnár János-barlangban élő populáció a troglomorfózis bizonyos jegyeit mutatja (11. ábra). Az egyedek különböző mértékben ugyan, de erősen depigmentáltak, a szemek strukturálisan csökevényesek, és gyengén, vagy egyáltalán nem pigmentáltak. A populáció egyedei a barlang keveredési zónáiban mindig nagy denzitásban fordulnak elő. Ezekben a zónákban ritkán ugyan, de előfordulnak teljesen pigmentált felszíni

morfológiájú egyedek is, melyek a Malom-tóban élő populációból származó egyedek (Pérez-Moreno & Balázs et al. 2017).



11. ábra. Az *Asellus aquaticus*, és a *N. hrabei* felszíni és barlangi egyedei a Molnár János-barlangból, és a Malom-tóból (Pérez-Moreno & Balázs et al., 2017 nyomán).

5.1.2. A *N. hrabei* és *A. aquaticus* populációkon végzett vizsgálatok elméleti hátterének ismertetése

A természetes rendszerekben gyakran megfigyelhetők a földrajzi távolságok génáramlást akadályozó hatása miatt kialakuló különböző genetikai mintázatok (Wright, 1943). Abban az esetben, ha a vizsgált mintázatban pozitív összefüggés van a földrajzi távolság, és a genetikai különbségek között, távolság szerinti izolációról (*isolation by distance*, IBD) beszélhetünk (Orsini et al., 2013; Manthey et al., 2015). A genetikai különbségek kialakulásában azonban más tényezők is szerepet játszanak, melyek nem magyarázhatóak pusztán a földrajzi távolságokkal. A biotikus és abiotikus interakciók számos mechanizmuson keresztül befolyásolhatják a génáramlást. Ilyen

mechanizmusok lehetnek például a lokális adaptáció, az eltérő diszperziós képesség, vagy a bevándorlók elleni szelekció. Ezek a mechanizmusok egy populáció élőhely szerinti izolációját (*isolation by environment*, IBE) eredményezhetik (Nosil et al., 2008; Wang & Bradburg, 2014; Manthey et al., 2015). A élőhely szerinti izoláció során pozitív összefüggés van a genetikai különbség, és az eltérő élőhely között, de nincs összefüggés a földrajzi távolság és a genetikai különbség között. Természetesen az IBD, és az IBE nem zárják ki egymást és elkülönítésük a legtöbb esetben nehéz (Wang & Bradburg, 2014). A barlangi, és a közvetlen közelükben lévő felszíni élőhelyek esetében rendkívül kis földrajzi távolságon belül nagyon eltérő élőhelyi feltételeket találunk. A legszembetűnőbb eltérés a fény hiánya, de az egyéb, részben a fény hiányából következő ökológiai és biogeokémiai különbségek is jelentősek. Az ilyen jelentős eltérések komoly génáramlási akadályt jelenthetnek, amely nagy mértékű genetikai különbség kialakulásához vezethet igen kis földrajzi távolságon belül (Mathieu et al., 1997; Tobler et al., 2008).

A barlangi élőhelyek kolonizációját magyarázó elméletek közül a *Climatic Relict Hypothesis* (CRH) esetében a felszínen élő populációkat a kedvezőtlen, vagy éppen tolerálhatatlanná váló felszíni viszonyok kényszerítik a szubterrán élőhelyekhez való alkalmazkodásra (Barr & Holsinger, 1985; Leys et al., 2003; Bryson et al., 2014), míg az *Adaptive Shift Hypothesis* (ASH) értelmezésében a kolonizáló populáció aktívan terjeszkedik az új élőhelyre, valamilyen új forrás kihasználásának érdekében (Rouch & Danielopol, 1987; Kane et al., 1992; Kano & Kase, 2004). A legtöbb esetben feltételezhetjük, hogy az aktuálisan tapasztalható mintázat kialakulásában nem tisztán az egyik, vagy a másik elmélet szerinti mechanizmus játszott csak szerepet, hanem a kettő valamiféle kombinációjának eredménye határozza meg egy adott szubterrán életközösség összetételét. Bármi is legyen azonban a kolonizáció mozgatórugója, annak sikerét nagymértékben befolyásolja, hogy az adott élőlény mennyire alkalmas a barlangi környezetben való életre, azaz milyen mértékű az exaptáció.

Az *A. aquaticus* és a *N. hrabei*, alapvetően felszíni előfordulású, de barlangokat kolonizáló fajok, és így ideális modellek a barlangi élőlények evolúciójának és adaptációjának vizsgálatához, valamint a kolonizációs mechanizmusok, és a génáramlást akadályozó barrierek szerepének megértéséhez. Míg az *A. aquaticus* olyan alapvetően felszíni faj, amely hajlamos akár jelentős troglomorfozist mutató barlangi populációkat

kialakítani (Veronvik et al., 2005, Konec et al., 2015), addig a *N. hrabei* egy alapvetően szubterrán, troglomorf genusz másodlagosan felszíni életmódra áttért faja (Lee & Cooper, 2001). Mindezek fényében a populációgenetikai vizsgálat során azt a hipotézist teszteltük, mely szerint a kevesebb barlangi exaptációt mutató *A. aquaticus* esetében az IBE lesz meghatározó, míg a troglomorf *N. hrabei* esetében az IBD lesz a fő mechanizmus a genetikai mintázat kialakulásában. A Molnár János-barlang, az azzal közvetlen hidrológiai kapcsolatban lévő Malom-tó és a velük szintén hidrológiai kapcsolatban lévő Duna kiváló természetes rendszert képez a barlangi kolonizáció és adaptáció vizsgálatára, mivel a két vizsgált faj mindhárom élőhelyen szimpatrikus előfordulást mutat. A populációgenetikai vizsgálatok során azt reméltük, hogy a két faj populációjánál tapasztalt genetikai mintázat segít az izoláció különböző formáinak és az exaptáció szerepének megértésében.

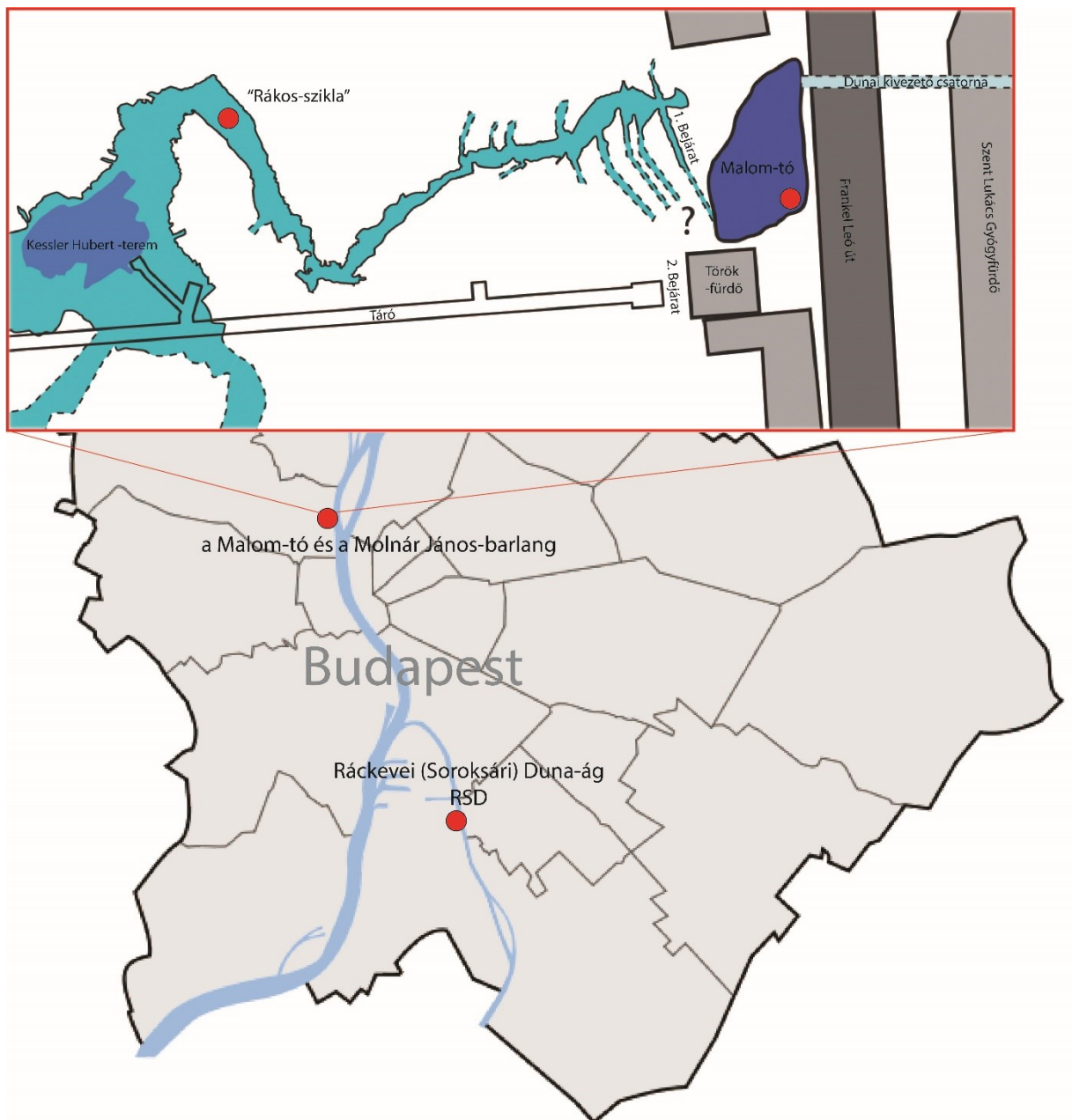
Az exaptációban és a barlangi élőhelyhez való adaptációban egyaránt fontos szerepet kap a troglomorfózis. A troglomorfózis jegyeit alapvetően két csoportra bonthatjuk. Az egyik csoport a progresszív változásokat foglalja magába, mint például a nem vizuális érzékszervek fejlődése (Turk et al., 1996; Li & Cooper, 2001, 2002; Mejía-Ortiz & Hartnoll, 2006), míg a másik csoportba a regresszív változások tartoznak, melyek során bizonyos szervek és tulajdonságok visszafejlődése tapasztalható (Sket, 1985; Wilkens, 1986; Mejía-Ortiz & López-Mejía, 2005; Bishop & Iliffe, 2009). A progresszív változások az evolúcióbiológiában általánosságban jól kutatottak, de a regresszív változások nyomon követése sokkal nehezebb feladat. A barlangi adaptációk jelentős része regresszív jellegű és ismétlődő mintázatot mutat nagyon különböző taxonoknál, ezért a barlangi fajok jó modellek lehetnek a regresszív evolúció megértéséhez. A legszembetűnőbb ismétlődő regresszív troglomorfózis a látószerv degradációja és végül elvesztése (Caccone & Sbordon, 2001; Protas et al., 2007; Pérez-Moreno et al., 2016). A folyamat megértésére irányuló vizsgálatok többsége a barlangi vaklazachoz (*A. mexicanus*) kapcsolódik. Az *A. mexicanus* számos szempontból ideális modellfaj. Széles elterjedési területén stabil felszíni populációkkal rendelkezik, ugyanakkor számtalan független helyszínen és időpontban kolonizált barlangokat. A barlangi populációk vizuális érzékelése rendre eltérő mértékű degradációt mutat (Jeffery & Martasian, 1998; Yamamoto & Jeffery 2000; Jeffery, 2001), amely lehetővé teszi a regresszív folyamatok részletes vizsgálatát. A barlangi fajok többségét kitevő gerinctelenek regresszív

evolúciójáról sokkal kevesebbet tudunk, jóllehet elképzelhető, hogy a különböző fejlődési ágakon egymástól eltérő mechanizmusok működnek (Pérez-Moreno et al., 2016). Általánosságban is elmondható, hogy a gerinctelen fajok vizuális érzékelésének folyamatáról a jól kutatott *Drosophila* (összefoglalás: Hardie & Juusola, 2015) kivételével elég keveset tudunk, bár az elmúlt években, köszönhetően a nem modell fajokra is alkalmazható genetikai módszerek elterjedésének a terület fejlődésnek indult (e. g. Cronin & Porter, 2014; Porter, 2016; Porter et al., 2017). A Molnár János-barlang, és a Malom-tó természetes rendszere az *A. aquaticus*, és a *N. hrabei* populációkkal jó feltételeket kínál a kérdés kutatására. Az egyik lehetséges kutatási irány a két faj fototranszdukciós kaszkádjához kapcsolódó molekuláris mintázat felderítése transzkriptom vizsgálattal és a tapasztalt különbségek értékelése (Pérez-Moreno et al., 2018a). A vizsgálat során arra kérdésre kerestük a választ, hogy a két eltérő háttérű faj milyen, esetlegesen eltérő transzkriptomer mintázatot mutat a fototranszdukciós kaszkád elemeinek tekintetében, valamint arra is kíváncsiak voltunk, hogy az esetlegesen termelt opszinok milyen filogenetikai információval szolgálnak (Pérez-Moreno et al., 2018b).

5.2. Anyag és módszer

5.2.1. Mintagyűjtés

A populációgenetikai vizsgálatához szükséges mintákat elsősorban három helyszínről, a Molnár János-barlangból, Malom-tóból, és a Ráckevei-Soroksári Duna-ágból (RSD) a Gubacsi-hídnál, Csepelen gyűjtöttük. Az *A. aquaticus* és a *N. hrabei* mindhárom helyen előfordul (12. ábra). A vizsgálatokhoz szükséges példányok gyűjtését a KTVF:32603-3/2013 (4762-5), a KTVF:12478-4/2014 valamint a PE/KTF/14718-3/2016 számú engedélyek alapján végeztem. A Molnár János-barlangban, és a Malom-tóban a példányokat bűvármerülések során gyűjtöttem egyeléses módszerrel, egy módosított "Sket-palack" (Chevaldonné et al., 2008) segítségével, míg az RSD gyűjtések planktonhálósval történtek.



12. ábra. A három fő vizsgálati populáció gyűjtési helyei. A Molnár János-barlangon belül a gyűjtések a Rákos-szikla elnevezésű barlangszakaszban történtek (Pérez-Moreno & Balázs et al., 2017 nyomán).

Mindhárom élőhelyről fajoként 20-20 példányt gyűjtöttem a vizsgálat céljaira. Kivételt képez ez alól a barlangi *N. hrabei* populáció, melyből 18 példány került gyűjtésre. Az *A. aquaticus* esetében további példányokat vontunk be a vizsgálatba az ország különböző pontjairól (2. táblázat), míg a *N. hrabei* esetében a GenBank-ban található, környező országokból származó szekvenciákat használtuk kiegészítésként (Copilaș-Ciocianu et al.,

2017). A példányokat a genetikai vizsgálat megkezdéséig 99%-os etanolban tartósítottuk. A transzkriptomer vizsgálatba mindhárom célpopulációból (Molnár János-barlang, Malom-tó, RSD) fajoként két-két példányt vontunk be, melyeket külön erre a célra gyűjtöttünk a többi gyűjtéshez használt módszereket alkalmazva. A mintákat az RNS kivonás megkezdéséig RNAlater®-ben (Sigma-Aldrich, Missouri, Egyesült Államok) - 80 °C-on tartósítottuk.

Faj	N	Helyszín	Koordináták	Habitat
<i>Asellus aquaticus</i>	20	RDS (Gubacsi-híd), Budapest, Magyarország	47.4360697 É, 19.0878143 K	Epigeal
	20	Molnár János-barlang, Budapest, Magyarország	47.5181846 É, 19.036064 K	Hypogean
	20	Malom-tó, Budapest, Magyarország	47.5181167 É, 19.036075 K	Epigeal
	4	Lipót, Magyarország	47.86316 É, 17.458875 K	Epigeal
	6	Polgár, Magyarország	47.869443 É, 21.200598 K	Epigeal
	6	Balatonfenyves, Magyarország	46.65515 É, 17.498538 K	Epigeal
	10	Cserdi, Magyarország	46.06575 É, 17.991012 K	Epigeal
<i>Niphargus hrabei</i>	20	RDS (Gubacsi-híd), Budapest, Magyarország	47.4360697 É, 19.0878143 K	Epigeal
	18	Molnár János-barlang, Budapest, Magyarország	47.5181846 É, 19.036064 K	Hypogean
	20	Malom-tó, Budapest, Magyarország	47.5181167 É, 19.036075 K	Epigeal
* <i>Niphargus</i> sp. nov. 1.	3	Molnár János-barlang, Budapest, Magyarország	47.5181846 É, 19.036064 K	Hypogean
* <i>Niphargus forroi</i>	2	Diabáz-barlang, Nagyvisnyó, Magyarország	48.08809 É, 20.46627 K	Hypogean

2. táblázat. A vizsgálat lefolytatásához gyűjtött fajokra vonatkozó mintaszámok, gyűjtési helyek és habitat típusok (Pérez-Moreno & Balázs et al., 2017 nyomán). RDS = Ráckevei-Soroksári Duna-ág. A külcsoporként használt taxonok *-al jelölve.

5.2.2. DNS kivonás és PCR

A DNS kivonása a járólábak, és az antennák felhasználásával DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Németország) használatával történt, a gyártó előírásai alapján. A lehető legjobb felbontás elérésének érdekében több molekuláris markert vizsgálatunk mindkét fajnál, melyek olyan génszakaszokra terjedtek ki, amelyek korábbi vizsgálatokban használhatónak bizonyultak hasonló taxonok intra-, és interspecifikus viszonyainak vizsgálatához (Bracken et al., 2009, 2010; Bracken-Grissom et al., 2011, 2013; Bybee et al., 2011), vagy elképzelésünk szerint növelték a felbontást (Miraldo et

al., 2012). Az *A. aquaticus* esetében ezek a következők voltak: mitokondriális riboszóma gének *12S*, *16S*, mitokondriális protein kódoló gén Citokróm-oxidáz I. alegység (*COI*), valamint a *NADH* dehidrogenáz 2. (továbbiakban *PseudoND2*) nukleáris mitokondriális DNS szakasz. A *N. hrabei* esetében a *16S* (mitokondriális riboszóma), a *COI* (mitokondriális proteinkódoló), az *ITS* (nukleális riboszóma) és a *NaK* (nukleáris proteinkódoló) génszakaszok vizsgálatára került sor. A PCR reakcióelegy a kivont DNS, a forward és reverse primerek, sterilizált, nem DEPC kezelt víz, és GoTaq® Green Master Mix (Promega, M712) felhasználásával készült. A hőprofil a következő volt: 1 perces 94°C-on történő denaturálás után 35-40 cikluson keresztül 1 perc 72°C-on, majd 30 másodperc 48-62°C-on (primertől és fajtól függően), majd 30 másodperc 94°C-on, majd lezáró lépésként 7 perc 72°C-on. A PCR termék tisztítását, és szekvenálását a Beckman Coulter Genomics (Danvers, Miami, USA) végezte (a primerekről, a PCR és a szekvenálás részleteiről bővebben lásd: Pérez-Moreno & Balázs et al., 2017).

5.2.3. RNS kivonás és szekvenálás

A teljes állat felhasználásával történő RNS kivonást TRIzol® reagenssel végeztük (ThermoFisher Scientific). A kivont RNS szekvenáláshoz való előkészítése rDNase® (Macherey-Nagel®), és NEBNext® Ultra™ II Directional RNA Library Prep Kit for Illumina alkalmazásával történt (további részletek: Pérez-Moreno et al., 2018b). A létrejött könyvtárak méret szerinti leválogatását Pippin Prep® (Sage Science) berendezéssel végeztük. A szekvenálást a GENEWIZ cég (South Plainfield, New Jersey, USA) végezte IlluminaVR HiSeq 4000 szekvenátor használatával.

5.2.4. Adatelőkészítés és feldolgozás

A PCR szekvenciák manuális ellenőrzése, tisztítása és javítása Geneious 8.0 (Kearse et al., 2012) programmal történt. A heterozigóta nukleáris szekvenciák elkülönítésére (phasing) a PHASE v2.1 (Stepens et al., 2001; Stepens & Donnelly, 2003), és a SeqPHASE (Flot, 2010) programokat használtuk. Azokban az esetekben, ahol az elkülönítés több mint egy valószínűsíthető párt eredményezett, a legmagasabb poszterior

valószínűséggel rendelkező párokat használtuk. A proteinkódoló szakaszokra ható szelekció jelenlétét MEGA 7 (Kumar et al., 2016) programmal teszteltük. Mivel a szekvenciák közötti eltérés elég kevés volt, ezért Nei-Gojobori módszerrel (Nei & Gojobori, 1986) becsültük a szinonim és nem szinonim szubsztitúciókat, és Fisher egzakt tesztjét alkalmaztuk a szelekció kimutatására (Zhang et al., 1997; Kumar et al., 2016;).

A haplotípus hálózatok megalkotásához a kis genetikai távolságok miatt az ilyen feltételek mellett is jól működő TCS (Templeton-Carndall-Sing) hálózatokat használtuk (Gerber & Templeton, 1996; Gomez-Zurita et al., 2000; Johnson & Jordan, 2000; Turner et al., 2000) a PopArt 1.7 (Leigh & Bryant, 2015) program segítségével. A haplotípus hálózatok mellett a mitokondriális haplotípusok relatív gyakoriságát, és földrajzi elterjedését is megjelenítettük a jobb átláthatóság miatt. A legjobban illeszkedő molekuláris evolúciós modelleket a PartitionFinder v1.1.1 (Lanfear et al., 2012) programmal választottuk ki (3. táblázat), majd a CIPRES portál használatával (Miller et al., 2010) futattuk le az összefűzött szekvenciák Maximum Likelihood (ML) (GARLI 2.01 [Zwicl, 2006]) és Bayes-i (MrBayes 3.2.6 [Ronquist & Huelsenbeck, 2003]) alapú törzsfák készítését. Az ML esetében 10 párhuzamos futtatást végeztünk, és a törzsfák elágazásainak támogatottsági értékeit *bootstrap* analízissel számoltuk ki. A *bootstrap* analízis során 40 független, 10.000 replikátummal dolgozó futtatás eredményeit összegeztük 95%-os konszenzus értékkel a DendroPy könyvtárban található SumTrees.py phyton script segítségével (Sukumaran & Holder, 2010). A Bayes-i törzsfák készítése során két független futtatást végeztünk. Mindkét futtatást 4 láncolattal 10 millió generációig végeztük. A Markov Chain Monte Carlo-t (MCMC) 1000 generációnként mintáztuk 25%-os *burn-in* frekvenciával. A Tracer v1.6 (Rambaut et al., 2014) programmal végzett konvergencia értékelés után a SummTrees.py használatával állapítottuk meg a Maximum Clade Credibility Tree-t (MCCT) és a törzsfák elágazásaihoz tartozó, posztterior valószínűségen alapuló támogatottsági értékeket. A különböző populációk szétválási idejét korábbi vizsgálatokban közel rokon taxonokra (Stenasellidae, és Niphargidae) használt COI szubsztitúciós rátákat felhasználva a BEAST (BEAST 2.4.0 [Drummond & Rambaut, 2007]) program segítségével futtatott törzsfákkal állapítottuk meg. A szubsztitúciós ráták millió évenként 1,25% (Ketmaier et al., 2003) és 0,34-0,76% (Lefébure et al., 2006) voltak. A BEAST analíziseket a Florida International University (Miami, Florida, USA) *High Performace Computing Cluster* (Panther) számítási

kapacitását kihasználva végeztük három önálló futtatást keretében. A 200 millió generációs futtatás után a Tracer v1.6 programmal végeztük el a konvergencia értékelést. Azokat a BEAST fajkeletkezési modellekkel futatott eredményeket, melyeknél nem találtunk bizonyítékot a konvergenciára elvetettük, míg a Yule fajképződési modellt használó, szigorú molekuláris órával futatott eredményeket megtartottuk a további analízishez. A 25%-os *burn-in* elvetése után az MCCT törzsfákon a TreeAnnotator (Drummond & Rambaut, 2007) modullal jelenítettük meg az elágazásokhoz tartozó poszterior valószínűségeen alapuló támogatottsági értékeket. A divergencia időket az R "Strap" (Bell & Lloyd, 2015) geoscale.phylo funkciójával ábráztuk, majd ezeket georeferáltuk egyedi szkriptekkel R "phytools" (Revell, 2012) környezetben. A populációk monofiletikus eredetének becsléséhez, Genealogical Sorting Index (*gsi*) értékeket (Cummins et al., 2008), majd azokból származtatott, és esetünkben megbízhatóbb Pairwise Genealogical Sorting Index (*pwgsi*) (Winter et al., 2016) értékeket számoltunk, melyek az intraspecifikus fejlődési ágak divergenciáját számszerűsítik. A *gsi*, és *pwgsi* értékek számításokhoz az R "genealogicalSorting" csomagját használtuk (R Development Core Team, 2008). A *pwgsi* elemzés során a *N. hrabei* nem budapesti populációkból származó egyedeit kihagytuk, mert az elérhető populáció szintű mintaszám elmaradt a módszer által támasztott minimumtól. A csökkentett adathalmaz használata nem befolyásolja a célpopulációk, azaz a Molnár János-barlangban, a Malom-tóban és a RSD-ben élő populációk összehasonlításának eredményeit. A fajok demográfia történetének becsléséhez *Extended Bayesian Skyline* (EBS) analízist (Ho & Shapiro, 2011) végeztünk a BEAST programba beépített modul segítségével (Howarth, 2004). A 200 millió generációs futtatás feltételei megegyeztek a korábbiakkal, kivéve, hogy a törzsfára vonatkozó prior beállítását "*Coalescent Extended Bayesian Skyline*"-ra változtattuk. A futtatások konvergencia értékeléséhez Tracer v1.6. programot használtuk, majd az EBS logokat összegeztük 25%-os *burn-in* elvetésével. A demográfiai történet eredményeinek megjelenítéséhez és értelmezéséhez erre a célra írt R szkripteket alkalmaztunk.

Faj	génszakasz	BEAST	MrBayes	GARLI
<i>Asellus aquaticus</i>	12S	HKY+G+X	HKY+G	TRN+G
	16S	HKY+G+X	HKY+G	TRN+G
	COI	HKY+G+X	HKY+G	HKY+G
	PseudoND2	HKY+G+X	HKY+G	HKY+G
<i>Niphargus</i> spp.	16S	HKY+G+X	HKY+G	HKY+G
	COI	HKY+G+X	HKY+G	HKY+G
	NaK	TRNEF+I	K80+G	TRNEF+I
	ITS	HKY+G+X	K80+I+G	K80+G

3. táblázat. A legjobban illeszkedő evolúciós modellek lókuszonként és alkalmazás szerint a PartitionFinder (Lanfear et al., 2012) program eredményei szerint (Pérez-Moreno & Balázs et al., 2017 nyomán).

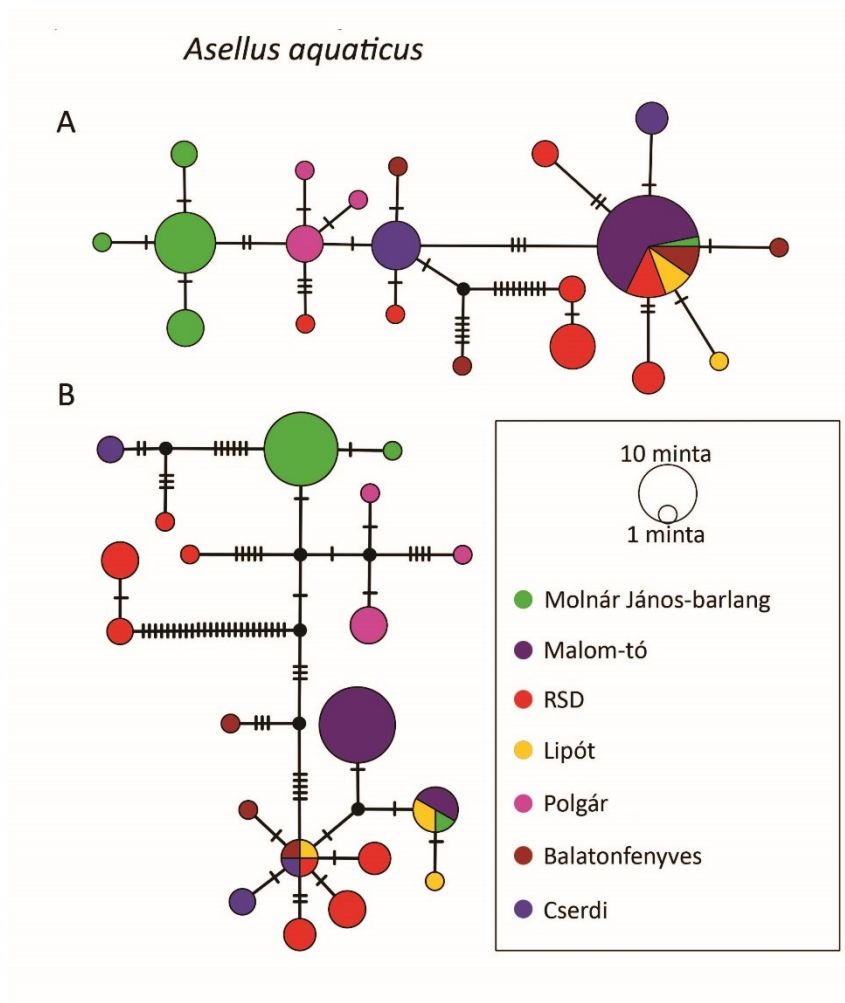
A transzkriptom vizsgálat során a nyers szekvenciák minőségének ellenőrzését a FastQC (Andrews, 2010) programmal végeztük, majd az adaptorok levágása Trimmomatic 0.36 (Bolger et al., 2014) programmal történt. A vágott, és minőség szerint kiválogatott szekvenciákat Rcorrector (Song & Florea, 2015) segítségével ellenőriztük a random olvasási hibák kiszűrésére, és az olvasási mélység normalizálására. A tisztított, és normalizált szekvenciákból Trinity pipeline 2.5.0 (Grabherr, et al., 2011; Haas et al., 2013) programmal nyertük a *de novo* összeállításokat (*assembly*). Az összefoglaló statisztikák elkészítését, és az összeállítások teljességének ellenőrzését Transrate 1.0.3 és BUSCO (Simão et al., 2015; Smith-Unna et al., 2016) programokkal végeztük (további módszertani részletek: Pérez-Moreno et al., 2018b). A fototranszdukciós kaszkádban résztvevő gének beazonosításához és az opszinok funkcionális osztályozásához a Pérez-Moreno és munkatársai (2018a) által alkalmazott módszert használtuk, melynek során az ORF-ek (*Open Read Frame*) által kijelölt szekvenciákat a fototranszdukciós kaszkádban szerepet játszó génekhez tartozó szekvenciákra szűkítettük PIA (*Phylogenetically-Informed Annotation*) (Speiser et al., 2014) alkalmazásával. Mivel az opszinok fehérjeszerkezete direkt megfeleltethető az érzékelhető hullámhosszoknak (e. g. Katti et al., 2010), azokat külön is megvizsgáltuk. A valószínűsíthető opszin

szekvenciákat a PROMAL3D (Pei & Grishin, 2014) programmal igazítottuk referencia opszin szekvencia adatbázis felhasználásával (n=910, Porter et al., 2012), mely tartalmazta a fő opszin típusokat és széles taxonómiai spektrumot ölelt fel. A Maximum Likelihood (ML) opszin törzsfát az IQ-tree (Nguyen et al. 2015) programmal készítettük el (további részletek: Pérez-Moreno et al., 2018b).

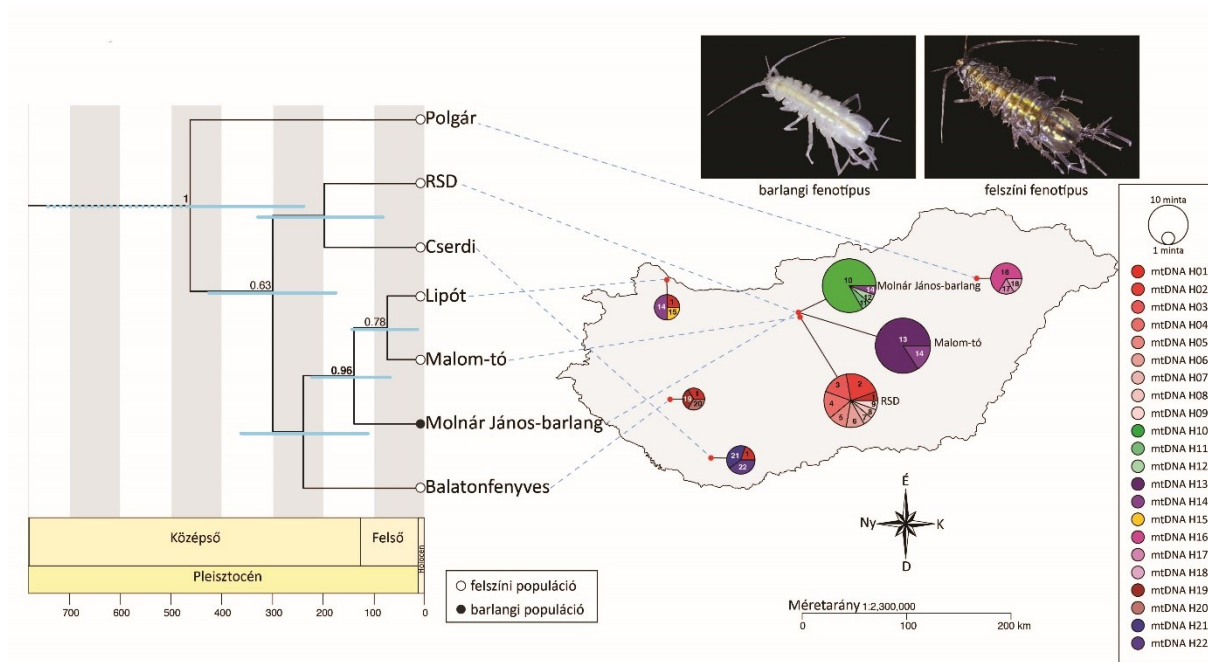
5.3. Eredmények

Az elvégzett populációgenetikai elemzések mindegyike abba az irányba mutatott, hogy míg az *A. aquaticus* esetében határozott genetikai strukturáltság figyelhető meg populációk szerint, addig a *N. hrabei* esetében ilyen nem tapasztalunk. A PCR-ok sikeressége változó volt (lásd: Pérez-Moreno & Balázs et al., 2017), de minden génszakaszra elegendő szekvencia állt rendelkezésünkre a tervezett elemzések elvégzéséhez. Az *A. aquaticus* esetében ez 81 *12S*, 83 *16S*, 76 *COI* és 84 *PseudoND2* szekvenciát jelentett. A különböző génszakaszok együttesen 1690 bázispár hosszúságot eredményeztek. A *N. hrabei* esetében 55 *16S*, 54 *COI*, 51 *ITS* és 58 *NaK* szekvenciát tudtunk bevonni az elemzésbe. Ezek a génszakaszok együttesen 2757 bázispár hosszúságot eredményeztek. A tisztított és meta-adatokkal ellátott szekvenciák a NCBI GenBank adatbázisban lettek mások számára is hozzáférhetővé téve.

A Fisher egzakt teszt eredménye minden génszakaszra nagyobb *P* értéket mutatott, mint a szignifikancia szint (0,05). Mivel ez alapján a génszakaszok nem állnak szekciós nyomás alatt, azokat használhatónak tekinthettük a további elemzésekhez. Az *A. aquaticus* haplotípus hálózatok tanúsága szerint a kis földrajzi távolság ellenére is egyértelmű elkülönülés látszik a Molnár János-barlangban, és a Malom-tóban élő populációk között (13. ábra). A Molnár János-barlangban és a Malom tóban talált haplotípusok egyaránt csak az adott élőhely egyedeire jellemzőek. Ez alól egyetlen kivétel az az egyed, amely ugyan a barlangból került gyűjtésre, de felszíni fenotípusú volt, és a Malom-tavi és más mintavételi helyszíneken előforduló haplotípusokat mutatta (13. és 14. ábra).

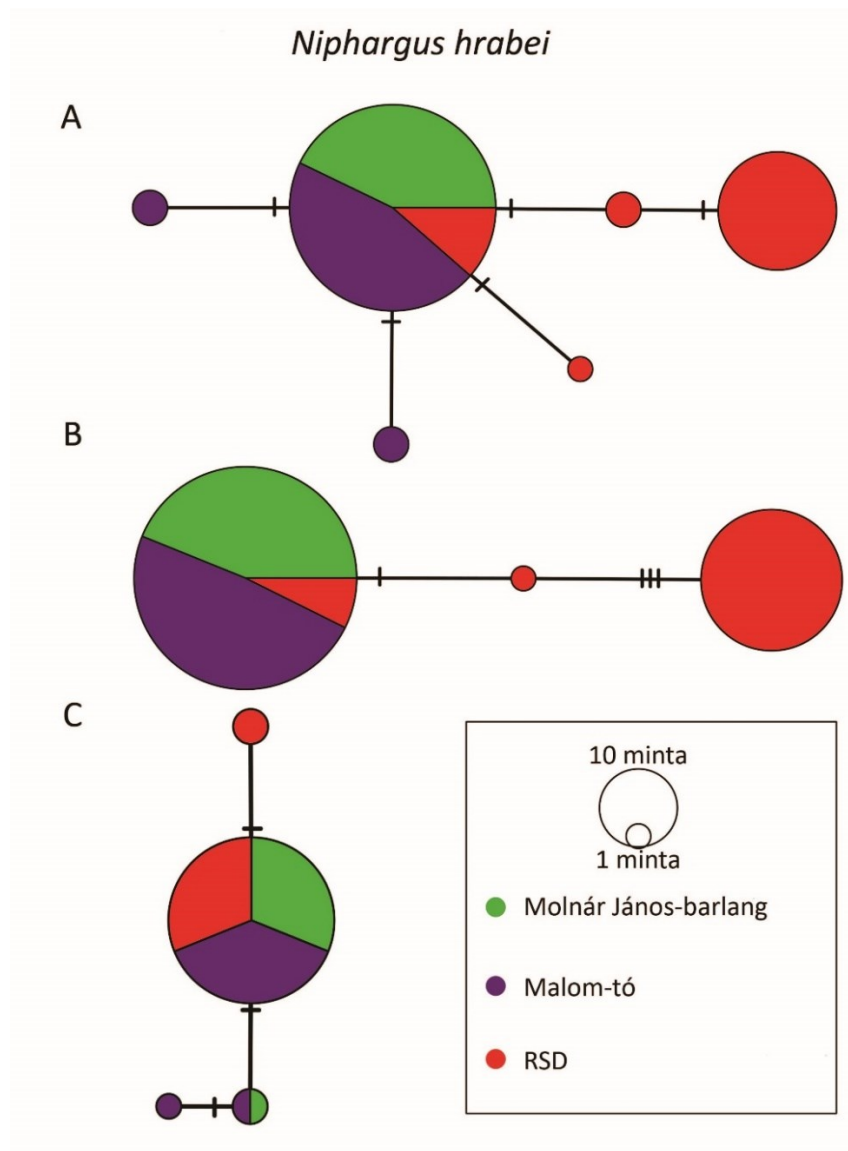


13. ábra. *Asellus aquaticus* haplotípus hálózatok: A) nukleáris PseudoND2 és B) mitokondriális COI, 16S, 12S génszakaszokra. A körök mérete a mintaszámmal arányos. A keresztvonalak a mutációs lépéseket jelenítik meg. A színezés a mintavételezési helyszíneket jelöli az ábrán feltüntetettek szerint (Pérez-Moreno & Balázs et al., 2017 nyomán).

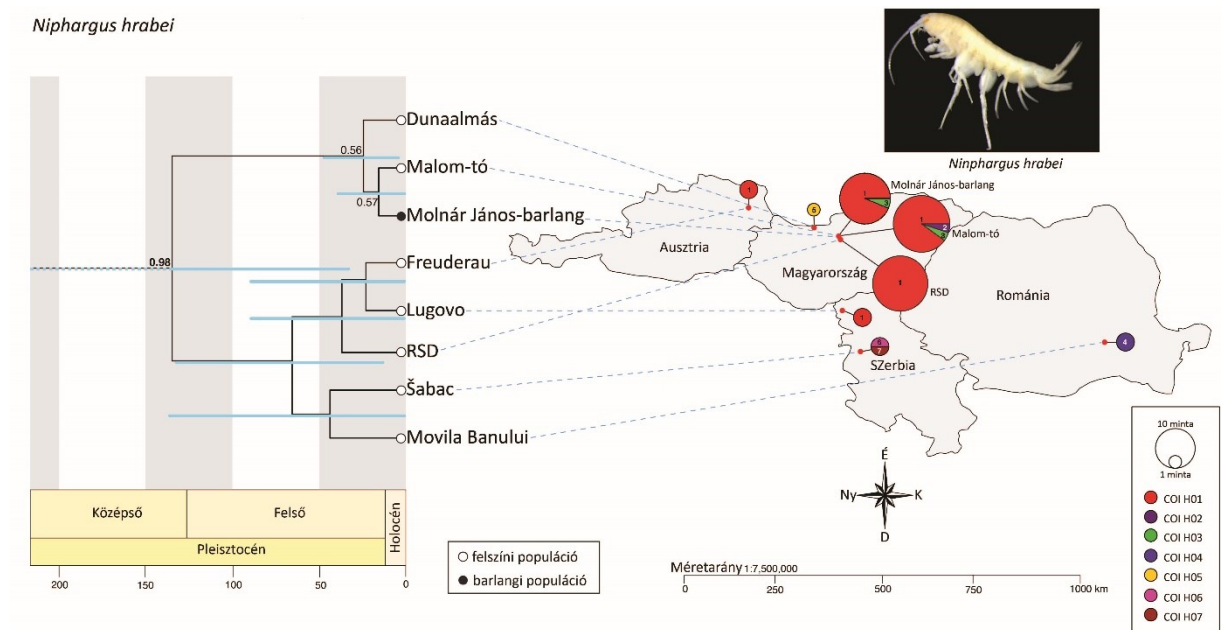


14. ábra. *Asellus aquaticus* populációk multilókusz BEAST eredmények alapján becsült elválási idejei (x tengelyen ezer években feltüntetve), és a mitokondriális haplotípusok relatív megoszlása populációk szerint (Pérez-Moreno & Balázs et al., 2017 nyomán).

A *N. hrabei* esetében az *A. aquaticus* populációkra jellemző elkülönülés egyáltalán nem figyelhető meg. A barlangban és a Malom-tóban ugyanazok a haplotípusok fordulnak elő (15. és 16. ábra). Az összefűzött szekvenciák alapján készült ML és Bayes-i törzsfák egy-két alacsony támogatottságú elágazást leszámítva egyik faj esetében sem tértek el egymástól, és összhangban voltak a haplotípus hálózatok eredményeivel és a BEAST fákkal (14. és 16. ábra). Az *A. aquaticus* BEAST fa tanúsága szerint a barlangi populáció elkülönülése egyértelmű (14. ábra). A becsült elválási időpont millió évenkénti 1,25%-os szubsztitúciós rátával (Ketmaier et al., 2003) megközelítőleg 60 ezer évvel ezelőttinek, míg 0,34-0,76%-os szubsztitúciós rátával (Lefébure et al., 2006) számolva megközelítőleg 139 ezer évvel ezelőttinek adódott, 95%-os Highest Posterior Density (HPD) alapján.



15. ábra. *Niphargus hrabei* haplotípus hálózatok: A) nukleáris ITS; B) nukleáris NaK és B) mitokondriális COI és 16S génszakaszokra. A körök mérete a mintaszámmal arányos. A keresztvonalak a mutációs lépéseket jelenítik meg. A színezés a mintavételezési helyszíneket jelöli az ábrán feltüntetettek szerint (Pérez-Moreno & Balázs et al., 2017 nyomán).



14. ábra. *Niphargus hrabei* populációk multilókusz BEAST eredmények alapján becsült elválási idejei (x tengelyen ezer években feltüntetve), és a COI haplotípusok relatív megoszlása populációk szerint (Pérez-Moreno & Balázs et al., 2017 nyomán).

A *pwsgi* értékek (4. táblázat) szintén egyértelműen jelzik a barlangi és a malom-tavi *A. aquaticus* populációk elkülönülését ($pwgsi = 1,00$, $p < 0,001$), míg a barlangi populáció a legkisebb *pwgsi* értéket a balatonfenyvesi populációval mutatja ($pwgsi = 0,22$, $p < 0,001$). A *N. hrabei* esetében semmilyen populációk szerinti genetikai strukturáltság nem volt kimutatható (5. táblázat). Ezzel összhangban a barlangi, és a malom-tavi populációk *pwgsi* értéke nem utal semmilyen geneológia elkülönülésre ($pwgsi = 0,14$, $p < 0,52$). Mindezek mellett mind a barlangi, mind a malom-tavi populáció statisztikailag szignifikáns és egymáshoz hasonlóan csekély mértékű elkülönülést mutat RSD populációtól ($pwgsi = 0,46$, $p < 0,001$ és $pwgsi = 0,48$, $p < 0,001$).

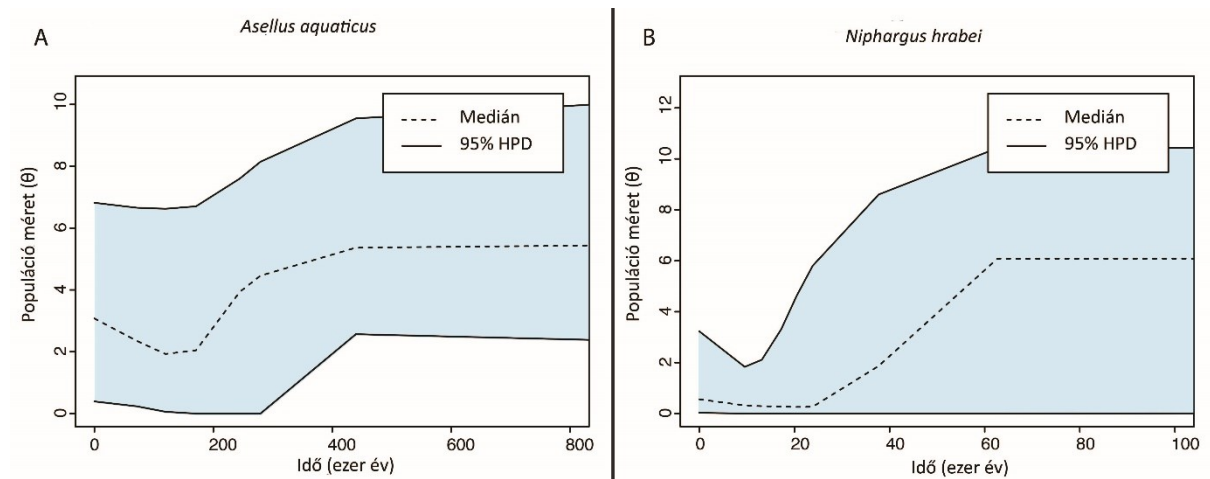
Populáció 1	Populáció 2	Bayes-i törzsfa		ML törzsfa	
		<i>pwgsi</i>	<i>p</i> -érték	<i>pwgsi</i>	<i>p</i> -érték
Molnár János-barlang	RSD	0.71	< 0.001	0.68	< 0.001
Molnár János-barlang	Malom-tó	1.00	< 0.001	1.00	< 0.001
Molnár János-barlang	Lipót	0.46	< 0.001	0.35	< 0.001
Molnár János-barlang	Polgár	0.89	< 0.001	0.89	< 0.001
Molnár János-barlang	Balatonfenyves	0.22	< 0.001	0.22	< 0.001
Molnár János-barlang	Cserdi	0.56	< 0.001	0.57	< 0.001
RSD	Malom-tó	1.00	< 0.001	1.00	< 0.001
RSD	Lipót	0.49	< 0.001	0.43	< 0.001
RSD	Polgár	0.89	< 0.001	0.89	< 0.001
RSD	Balatonfenyves	0.17	0.003	0.13	0.001
RSD	Cserdi	0.46	< 0.001	0.43	< 0.001
Malom-tó	Lipót	1.00	< 0.001	1.00	< 0.001
Malom-tó	Polgár	1.00	< 0.001	1.00	< 0.001
Malom-tó	Balatonfenyves	1.00	< 0.001	1.00	< 0.001
Malom-tó	Cserdi	1.00	< 0.001	1.00	< 0.001
Lipót	Polgár	1.00	< 0.001	1.00	< 0.001
Lipót	Balatonfenyves	0.38	< 0.001	0.23	< 0.001
Lipót	Cserdi	0.47	< 0.001	0.47	< 0.001
Polgár	Balatonfenyves	0.78	< 0.001	0.78	< 0.001
Polgár	Cserdi	0.83	< 0.001	0.83	< 0.001
Balatonfenyves	Cserdi	0.15	0.012	0.15	< 0.001

4. táblázat. Az *Asellus aquaticus* populációpárok *pwgsi* és *p* értékei (Pérez-Moreno & Balázs et al., 2017 nyomán).

Populáció 1	Populáció 2	Bayes-i törzsfa		ML törzsfa	
		<i>pwgsi</i>	<i>p</i> -érték	<i>pwgsi</i>	<i>p</i> -érték
Molnár János-barlang	RSD	0.46	< 0.001	0.15	< 0.001
Molnár János-barlang	Malom-tó	0.14	0.521	0.06	0.005
Malom-tó	RSD	0.48	< 0.001	0.18	< 0.001

5. táblázat. A *Niphargus hrabei* populációpárok *pwgsi* és *p* értékei (Pérez-Moreno & Balázs et al., 2017 nyomán).

A demográfiai történettel kapcsolatban elvégzett EBS elemzés során elsősorban arra voltunk kíváncsiak, hogy a vizsgált fajoknál a múltban lezajlott populációméret változások kapcsolatba hozhatóak-e klimatikus változásokkal? Az *A. aquaticus* EBS grafikus megjelenítése egy fokozatos méretcsökkenést mutat, amely a minimumát 100-160 ezer évvel ezelőtt éri el, majd utána egy egészen napjainkig tartó felívelés következik (17. ábra A). Ezzel szemben a *N. hrabei* esetében az EBS alapján egy gyorsabb lefolyású és később bekövetkezett populációméret csökkenés látszik nagyjából 60 ezer évvel ezelőtti kezdettel, melyet egy megközelítőleg 10 ezer évvel ezelőtti határozott mélypont, majd egy gyors felívelés követ (17. ábra B). A mélypont időpontja jó összefüggést mutat a Würm glaciális végének megközelítőleg 11 ezer évvel ezelőtti időpontjával.



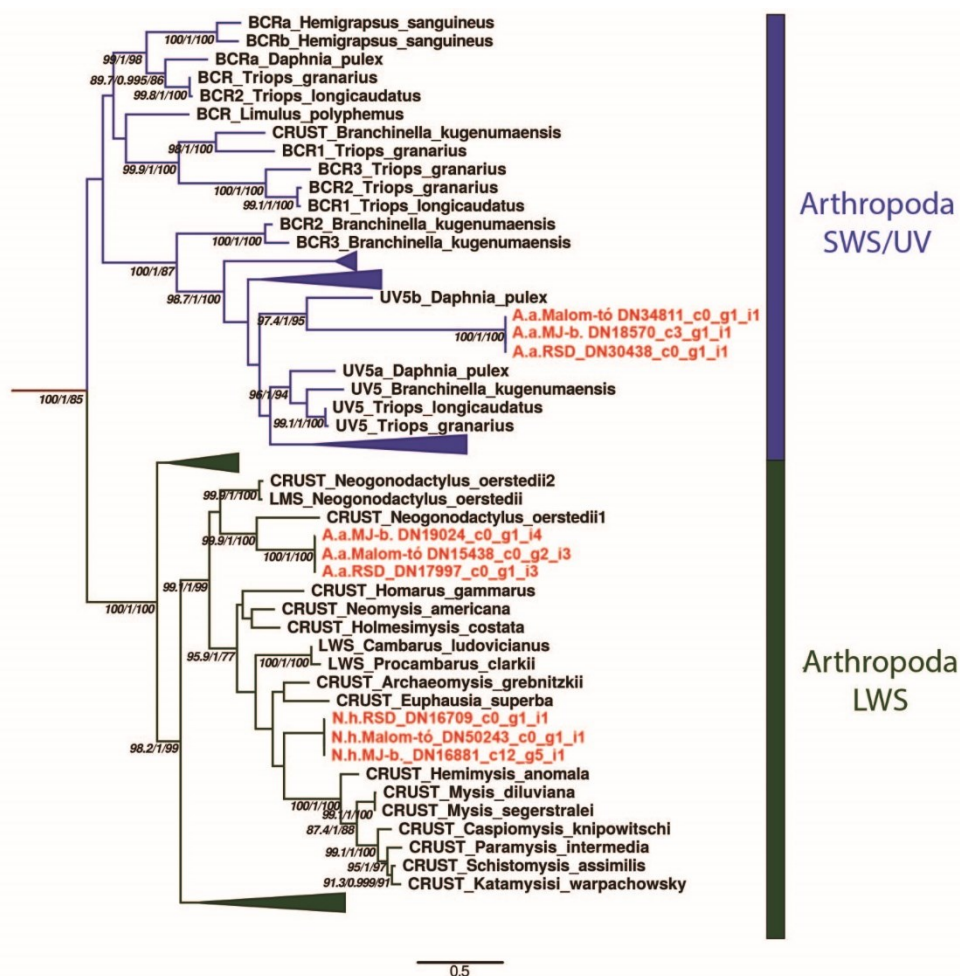
17. ábra. *Extended Bayesian Skyline* (EBS) eredmények grafikus ábrázolása: A) az *Asellus aquaticus* mintázott populációinak méretváltozása; B) a *Niphargus hrabei* mintázott populációinak méretváltozása (Pérez-Moreno & Balázs et al., 2017 nyomán).

A transzkriptom vizsgálat kiindulásaként 380 millió olvasás (*read*), és megközelítőleg 115 gigabázis adat keletkezett a 12 minta szekvenálásából. A nyers adatokat a NCBI Sequence Read Archive adatbázisba feltöltve tettük hozzáférhetővé. Az *A. aquaticus de novo* transzkriptom összeállítások 86903-123735 contig-et tartalmaztak 938-1076 átlagos bázispár hosszúsággal. Ezek közül 25562-30264 (50,42-53,29%) szekvencia

tartalmazott ORF-et, valószínűsítve a szakasz protein kodoló jellegét. A *N. hrabei* esetében 107451-134592 contig keletkezett 874-883 bázispár átlagos hosszúsággal. Ezek közül 20669-27159 (46,8-48,53%) szekvencia tartalmazott ORF-et, valószínűsítve a szakasz protein-kódoló jellegét. A *de novo* szekvenciákra vonatkozó, azok folytonosságát (*contiguity*) leíró N50 értékek (*A. aquaticus*: 1737-2022 bp; *N. hrabei*: 1598-1648 bp), és a BUSCO eredményei (*A. aquaticus*: 91,3-93,6%, *N. hrabei*: 82-90,5% teljes BUSCO szekvencia) mindkét faj esetében kielégítőnek mutatkoztak (részletesen: Pérez-Moreno et al., 2018b).

A PIA kritériumai szerinti filogenetikai elemzés során az *A. asellus* esetében a fototranszdukciós kaszkád majdnem minden elemét sikerült beazonosítani az összes populációnál. Ez azt jelenti, hogy a barlangi populáció egyedei feltehetőleg megőrizték fényérzékelési képességüket a csökevényes látószervek ellenére is. A jelen vizsgálat csak kvalitatív értékelést tesz lehetővé, így az nem tudható belőle, hogy a résztvevő gének szabályozása hogyan alakul. Elképzelhető, hogy a kaszkád elemeinek expressziója valamilyen alap szinten maradva, de folyamatosan jelen van és a látás képességének elvesztéséhez más változások vezetnek. A *N. hrabei* transzkriptomer kevesebb kaszkád elemet tartalmazott, ami jól magyarázható a genusz ősi, megközelítőleg 88 millió évvel ezelőtti szubterrán eredetével (McInerney et al., 2014). Érdekes megjegyezni, hogy az, hogy egy transzkriptomból nem mutatható ki egy gén, nem jelenti azt, hogy az adott gén pszeudogenizálódott, vagy eltűnt a génállományból, inkább arra utal, hogy az adott körülmények között nem expresszálódik. A rabdomer fotorecepcióhoz köthető gének (*trp*, és *rdgB*) expressziója a felszíni *N. hrabei* populációkban felveti a lehetőségét valamiféle extraokuláris fényérzékelésnek.

Az *A. aquaticus* transzkriptomjai egy rövid hullámhosszra (SWS/UV) érzékeny, és egy hosszú hullámhosszra érzékeny (LWS) opszint tartalmaztak. Ezek az opszinok az összes populációban azonosak voltak. Ezzel ellentétben a *N. hrabei* transzkriptomjai nem tartalmaztak SWS/UV opszinokat, csak egyetlen LWS opszint, mely minden populációban teljesen azonos volt (18. ábra).



18. ábra. Arthropoda LWS és SWS/UV opszin törzsfa. A könnyebb átláthatóság kedvéért a nem Crustacea kládok összevonva vannak megjelenítve. A támogatottsági értékek az SH-aLRT/aBayes/UFBoot értékeknek felelnek meg és a 70-nél alacsonyabb SH-aLRT értékek nincsenek feltüntetve (Pérez-Moreno et al., 2018b nyomán).

Az azonosított opszin szekvenciákat páronként hasonlítottuk össze szarvasmarha (*Bos taurus*), és atlanti hosszúszárnyú kalmár (*Todarodes pacificus*) rodopszin referencia szekvenciákkal (5. táblázat) annak érdekében, hogy képet kapjunk az aminosav szubsztitúciókról és azok spektrális szenzitivitásra gyakorolt lehetséges hatásairól (Palczewski, et al., 2000; Takahashi & Ebrey, 2003; Katti et al., 2010). Az *A. aquaticus* SWS/UV opszin esetében a referencia bovin opszin 90-es pozícióban lizin reziduális található, mely az opszin UV érzékenységre utal (Salcedo et al. 2003), ami összhangban

van a filogenetikai eredményekkel (18. ábra) Az *A. aquaticus* és *N. hrabei* LWS opszinok a bovin rodopszin 126-os és 269-es pozíciójában térnek el egymástól. Ezeknek az eltérésnek az értelmezése jelenlegi tudásunk alapján nem lehetséges. Az LWS opszin mindkét fajnál a bovin opszin 292-es pozíciójában alanin helyett szerin reziduálissal rendelkezik. Ez az eltérés bizonyítottan képes eltolni az opszin érzékenységet a hullámhossz tartományon belül mindkét irányba (Salcedo et al., 2009; Katti et al., 2010).

faj és opszin típus	pozíció									
	90	113	118	122	126	164	211	269	292	295
referencia Bovin	G	E	T	E	W	A	H	A	A	A
referencia Squid	G	Y	G	F	M	S	G	A	V	A
<i>Asellus aquaticus</i> SWS/UV	K	Y	A	P	V	P	V	A	A	C
<i>Asellus aquaticus</i> LWS	M	Y	S	C	Y	S	V	C	S	A
<i>Niphargus hrabei</i> LWS	M	Y	S	C	W	S	Y	L	S	A

5. táblázat. Aminósavak az azonosított opszinok azon a referencia pozícióiban melyekről tudott, hogy befolyásolják a spektrális érzékenységet.

5.4. Diszkusszió

A populációgenetikai vizsgálat legszembetűnőbb eredménye az *A. aquaticus* barlangi és felszíni populációinak határozott elkülönülése, amely mintázat nem jellemző a *N. hrabei* populációkra. A vizsgálat elsődleges célja az volt, hogy a felszíni és barlangi *A. aquaticus* és *N. hrabei* populációk genetikai mintázatának elemzésével választ kapjunk arra kérdésre, hogy a barlangi környezet mennyire működik barrierként a különböző exaptációt mutató fajokra nézve. A magyarországi *A. aquaticus* populációk genetikailag igen változatosak és minden vizsgált populációban megtalálhatóak voltak olyan haplotípusok, amelyek csak az adott populációra jellemzőek. Az összes általunk végzett elemzés szerint a Molnár János-barlangban élő populáció és a felszíni populációk határozottan elkülönülnek egymástól, közöttük génáramlásra utaló jeleket nem találtunk. Az eredmények tanúsága szerint a barlangi, és felszíni populációk között tapasztalható genetikai, és fenotípusos eltérések a barlangi környezet izoláló hatásának tudhatóak be. A fennálló különbségek ellenére a barlangi populáció egyedei filogenetikai

kontextusban az *A. aquaticus* fajhoz tartoznak (14. ábra). A minden mintázott nyugat-magyarországi populációban előforduló haplotípus (mtDNA H01) esetenként nagy távolságokra kiterjedő diszperziót valószínűsít. Ebből azt a feltételezést tehetjük, hogy a fajnál a földrajzi távolság nem feltétlenül játszik jelentős szerepet a genetikai elkülönülés kialakulásában (14. ábra). Az RSD-ből származó mintáknál tapasztalt viszonylagosan magas haplotípus diverzitás a Duna diszperzióban betöltött szerepét emeli ki.

A barlangi élőhelyről begyűjtött felszíni fenotípussal rendelkező egyed a malom-tavi populációra jellemző haplotípusokkal rendelkezett. Az elvégzett bűvármerülések során a barlang bejáratától távol eső részein (több mint 150 m) nem is gyakran, de rendszeresen megfigyelhetők voltak teljesen felszíni fenotípussal rendelkező egyedek. Mivel a genetikai vizsgálatok eredményei szerint nincsenek egyező mitokondriális és nukleáris haplotípusok a felszíni, és a barlangi fenotípust mutató egyedeknél, ezért a két populáció egyedei közötti szaporodás vagy igen ritka, vagy egyáltalán nem fordul elő. Hasonló helyzet figyelhető meg szlovéniai és romániai barlangi populációknál, ahol a közeli felszíni populációkkal való genetikai kapcsolat szintén nem volt kimutatható annak ellenére sem, hogy felszíni fenotípusú egyedek rendszeresen előfordultak a barlangokban (Turk et al., 1996; Konec et al., 2015). Ez az ismétlődő mintázat számos mechanizmussal magyarázható, melyek közül mindegyik végső soron visszavezethető a barlangi és felszíni élőhelyek közötti különbségekre (Nosil et al., 2008; Wang & Bradburg, 2014; Manthey & Moyle, 2015). Ilyen mechanizmus lehet a kompetitív kizárás, mely során a feltételezhetően az adott környezetben jobb kompetíciós képességgel rendelkező troglomorf rezidens egyedek még a sikeres szaporodás előtt kiszorítják a betévedő felszíni egyedeket. Szintén elképzelhető hogy, a hibridek életképtelenek, vagy jelentősen kisebb fitnessszel rendelkeznek, és így genetikai állományuk nem marad fenn a populációban. Ezeken kívül nem zárhatjuk ki azt sem, hogy valamilyen nem feltárt prezigótikus mechanizmus akadályozza meg a két populáció közötti génáramlást. A génáramlást akadályozó tényezők meghatározása bár igen nehéz feladat, kétség kívül jelentős jövőbeli lépés lehetne a kolonizációs, izolációs és fajkeletkezési folyamatok megértéséhez.

A barlangi, és felszíni *N. hrabei* populációk a törzsfa, és haplotípus hálózat elemzések alapján semmilyen genetikai elkülönülést nem mutattak (15. és 16. ábra). A fajt az általunk vizsgált populációkban általánosságban is alacsony haplotípus diverzitás

jellemzi. Az egyetlen strukturáltság a barlangi, a malom-tavi és a dunaalmási populációk elkülönülése a többi vizsgált populációtól. Azonban az RSD populáció ehhez viszonyított elhelyezkedése az osztrák, szerb és román populációkkal egy kládban földrajzi okokkal nem igazán magyarázható. Mivel a fajt széles elterjedése ellenére alacsony genetikai változatosság és gyenge strukturáltság jellemzi, a populációk minden valószínűség szerint egy recens expanzió eredményeiként jöttek létre (lásd még Copilaş-Ciocianu et al., 2017), és így ezek a populációk nem szolgáltathatnak bizonyítékot sem az IBD-re sem az IBE-re. A genetikai strukturátlanságból feltételezhető recens expanziót az EBS elemzés is alátámasztja, mivel az a mintegy 10 ezer évvel ezelőtti palacknyak után erőteljes expanziót mutat. Érdemes megjegyezni, hogy néhány populáció esetében a mintaszám nem biztos, hogy elegendő volt a populációk közötti lehetséges strukturáltság felderítéséhez. A három célpopuláció (Molnár János-barlang, Malom-tó, RSD) esetében azonban elegendő minta állt rendelkezésünkre, hogy a vizsgálatban alkalmazott módszerek szerinti strukturáltságot kimutassuk, amennyiben az létezik. Mivel a célpopulációk közötti bárminemű elkülönülés hiányzik, ezért feltételezhetjük, hogy a minden élőhelyen troglomorf *N. hrabei* számára a barlangi környezet nem jelent barriert. A genetikai strukturáltság hiánya magyarázható azzal, hogy mivel a barlangi környezet az exaptáció miatt nem barrier, ezért a barlang és a külvilág közötti génáramlás kétirányú és folyamatos, de nem zárhatjuk ki azt sem, hogy csak a recens kolonizáció mellékterméke. A kérdés az általunk alkalmazott módszerekkel nem dönthető el. A helyzet tisztázásához nagyobb érzékenyséű molekuláris módszerekkel elvégzett további vizsgálatok szükségesek.

A Peracarida rákok esetében mások által alkalmazott molekuláris óra ráták (Ketmayer et al., 2003; Lefébure et al., 2006) alapján a malom-tavi és a Molnár János-barlangban élő *N. hrabei* populáció megközelítőleg 60-140 ezer évvel ezelőtt vált el egymástól (14. ábra). Jóllehet ez elég bizonytalan, és tág becslés, azt mindenképpen kijelenthetjük, hogy a szétválás az igen gyorsan, gyakran és markánsan változó klimatikus viszonyokat felvonultató felső-pleisztocén idejére esett. Ezek a változó viszonyok számos taxon elterjedési mintázatán nyomot hagytak (Hewit, 2004; Bryson et al., 2014). Annak ellenére, hogy Magyarország területére a negyedidőszaki jégkorszakok alatt nem terjedt ki az állandó jégtakaró, időszakonként igen kedvezőtlen körülmények alakulhattak ki a felszíni vizekben élő gerinctlenek számára (Hewit, 2004; Bryson et al., 2014).

A barlangok viszonylagosan állandó környezete kiváló refúgium gyorsan változó felszíni körülmények esetén (Howarth, 1983; Hewit, 2004; Allegrucci et al., 2005; Verovnik et al., 2005; Prendini et al., 2010; Bryson et al., 2014). A mélységi meleg vizek által táplált Molnár János-barlang, de ilyen szempontból inkább a BTK mint hidrológiai egység, kedvezőtlen klimatikus viszonyok esetén jó feltételeket kínál azoknak az élőlényeknek, melyek exaptációjuknak köszönhetően képesek túlélni, és alkalmazkodni barlangi környezetben. Elképzelhető, hogy az *A. aquaticus*, mint közepes exaptációval rendelkező faj refúgiumként használta a barlangot, ahol felszíni populációktól izoláltan fejlődött tovább, míg végül adaptív és neutrális folyamatok által kialakult a troglomorf populáció. Az általunk végzett vizsgálatok eredményeinek bizonytalansága nem teszi lehetővé, hogy pontos képet kapjunk a kolonizáció és szétválás mögött álló folyamatok időbeli lefolyásáról. Azonban amennyiben a két fő kolonizációs hipotézis mentén próbáljuk értelmezni a jelenlegi mintázatokat, akkor a rendelkezésre álló eredmények alapján, pusztán spekulatív jelleggel lehetséges különböző elképzelhető értelmezéseket tenni. Mivel a barlangban a jelenlegi, a faj számára kedvező felszíni körülmények között is kis egyedszámban, de majdnem mindig megfigyelhetőek felszínről származó egyedek, ezért feltételezhetjük, hogy a kezdeti kolonizációs lépés inkább az ASH-val magyarázható. Ilyen módon elképzelhető egy az exaptáció mértéke által befolyásolt mértékű génáramlással jellemezhető időszak. Az EBS tanúsága szerint jelentős populációméret csökkenés következett be megközelítőleg 100-200 ezer évvel ezelőtt, ami kedvezőtlen körülményekre utal. Elképzelhető, hogy ekkor inkább a CRH-val magyarázható folyamatoké lett a főszerep és a faj refúgiumként használta a barlangot, ahol nem csak az állandó, viszonylag magas víz hőmérséklet, hanem a kemoautotróf baktériumok jelenléte (Borsodi et al., 2012) miatt a felszíni körülményektől független táplálékforrás is biztosíthatta a túlélést. A kedvező felszíni körülmények újbóli kialakulásával a visszatérő, vagy új felszíni populációk a kompetitív kizárás miatt már nem tudják sikeresen kolonizálni a barlangot, mint ahogy a troglomorf populáció egyedei sem tudnak sikeresen felszíni élőhelyeket meghódítani.

A *N. hrabei* feltehetőleg több ezer évvel később jelent meg a barlangban, mint az *A. aquaticus*. A felszíni és barlangi élőhelyek populációi a vizsgálat alapján pánmitikusnak mutatkoznak, a barlangi egyedek genetikailag nem különülnek el a felszíniektől. A *N. hrabei* jó diszperziós képességét és kivételes alkalmazkodóképességét jól mutatja a faj

széles elterjedési területe, és az hogy, ezen belül igen különböző feltételeket kínáló élőhelyeken is előfordul (Copilaş-Ciocianu et al., 2017; 2018). A jó alkalmazkodóképesség további bizonyítéka, hogy a faj annak ellenére kolonizálta sikeresen a Molnár János-barlangot, hogy ott az *A. aquaticus*, a *N. sp. nov. 1.* és a *N. sp. nov. 2.* vélelmeshetően kompetítorként vannak jelen. Mivel azonban a rendelkezésre álló eredményekből nem tudhatjuk biztosan, hogy a *N. hrabei* állandó, szaporodó populációval van-e jelen a barlangban, létezik egy alternatív magyarázat is. Elképzelhető, hogy a *N. hrabei* korábban is jelen volt a barlangban, azonban a felszínről történő folyamatos migráció nélkül a kompetítorok kiszorították a barlangból és így az EBS eredményeken látszó megközelítőleg 10 ezer évvel ezelőtt bekövetkezett igen határozott populációméret csökkenéskor eltűnt onnan, és jelenlegi barlangi előfordulása az azóta bekövetkező expanzióval függ össze.

Az *A. aquaticus* transzkriptom elemzése szerint a fototranszdukciós kaszkád fő elemei a faj mindhárom vizsgált populációjában expresszálnak. A barlangi *A. aquaticus* egyedek elhanyagolható különbségekkel ugyanazokat az opszinokat termelik, mint a felszíni populációk tagjai. A megtalált SWS/UV opszin a szekvenciák hosszától eltekintve teljesen megegyezik a mindhárom populációval. Ez a hosszbeli eltérés azonban feltehetőleg az alkalmazott eljárások során fellépő esetleges fragmentációnak köszönhető. A felszíni és barlangi populációk közötti szignifikáns eltérés hiánya nem igazán meglepő, tekintve a barlangi populáció viszonylag recens becsült divergenciáját (Pérez-Moréno & Balázs et al., 2017). A *N. hrabei* esetében mind a felszíni populációk, mind a barlangi populáció egyedeinél megtalálható volt a fototranszdukciós kaszkád sok eleme, beleértve a minden populációval azonos LWS opszinokat is. A *N. hrabei* fajnak egyértelműen nincsen szeme, így az opszin termelés feltehetőleg valamiféle extraokuláris fényérzékelésre utal, ahogy azt más fajok esetében már korábban kimutatták (Kelley & Davies, 2016). Ausztrál szubterrán vízi bogaraknál (Coleoptera: Dytiscidae) negatív fototaxist figyeltek meg a teljesen fény nélküli élőhelyük ellenére (Tierney et al., 2015; Langille et al. 2018). Elképzelhető, hogy a fényérzékenység képessége a kolonizáció után egyszerűen sokáig fennmarad. Ennek a feltételezésnek némileg azonban ellentmond az a tény, hogy a jelenséget több troglobiont élőlény esetében is megfigyelték (pl. Carlini et al., 2013) beleértve számos *Niphargus* fajt is (pl. Borowsky, 2011; Fišer et al., 2016), tehát nemcsak azt feltételezhetjük, hogy elterjedt

jelenségről van szó, hanem azt is, hogy a fényérzékelés képességének megtartása előnyös a régóta barlangi életmódra áttért élőlények számára, például az által, hogy így elkerülhetik a számukra potenciális veszélyekkel járó felszíni élőhelyre való kikerülést. Az Ausztrália karsztvidékeinek barlangjaiban élő bogarak LWS opszinjaira végzett szelekciós tesztek azt mutatták, hogy a vonatkozó génekre tisztító szelekció hat (Tierney et al., 2015). Hasonló eredményeket találtak az *A. mexicanus* barlangi modellfaj esetében is, ahol az egyedfejlődés korai szakaszában az opszinok átírása megfigyelhető volt, míg felnőtt egyedeknél olykor hiányzott (Langecker et al., 1993). Ezek az eredmények felvetik annak a lehetőségét is, hogy barlangi fajoknál az LWS opszinok esetleg pleiotropikus jellegűek. Jelenleg ennek a lehetőségnek a valószínűségéről kevés információ áll rendelkezésünkre, de Zanini és munkatársai (2018) *Drosophila* opszinokat vizsgálva azt találták, hogy azok proprioreceptorokban történő expressziója esetlegesen kapcsolatba hozható a ciliumok szerveződésével, és a mechanotranszdukcióval, így tehát elképzelhető valamiféle hasonló szerep troglobiont élőlényeknél is.

6. Következtetés és kitekintés

A magyarországi stygobiont faunával kapcsolatos vizsgálatok, hazánk földrajzi elhelyezkedése folytán jelentős nemzetközi érdeklődésre tartanak számot. Az elmúlt évtizedek során a barlangbiológia hazai kutatása komoly lemaradásba került a nemzetközi folyamatokhoz képest. A jelen dolgozatban ismertetett vizsgálati kérdések megfogalmazásakor nem csak a célzott kérdésfelvetés relevanciáját vettem figyelembe, hanem azt is mérlegeltem, hogy az adott vizsgálat mennyire teremt alapot a későbbi kutatási irányok kijelöléséhez, akár más hazai, vagy külföldi kutatók számára.

Az első lépés az általam választott modell taxon, a *Niphargus* genusz hazai fajait érintő rendszertani kérdések tisztázása volt, irodalmi, morfológia és genetikai adatok alapján. A vizsgálat során megállapítást nyert, hogy az irodalmi említésekben szereplő 27 faj közül mindössze 8 valid faj része bizonyítottan a hazai faunának (*N. molnari*, *N. hrabei*, *N. valachicus*, *N. gebhardti*, *N. aggtelekiensis*, *N. tatrensis*, *N. forroi*, *N. hungaricus*). Ezek közül a *N. tatrensis* hazai populációjának taxonómiai helyzetét nem sikerült megnyugtatóan tisztázni. A téves határozásoknak, az ország területi

változásainak és az elégtelen adatközlésnek köszönhetően 17 faj nem tekinthető a magyar fauna részének. A felszíni előfordulású *N. mediodanubialis* a korábbi vélekedésnek megfelelően (S. Karaman, 1950), immár genetikai adatokkal is megerősítve a *N. valachicus* junior szinonimájának bizonyult (Copilaş-Ciocianu et al., 2017; 2018). A *N. thermalis* fajról a populációgenetikai vizsgálatoknak köszönhetően (Copilaş-Ciocianu et al., 2017; 2018, Pérez-Moreno & Balázs et al., 2017) bebizonyosodott, hogy a *N. hrabei* junior szinonimája. A terepi gyűjtések során további három új, leírásra váró fajt találtunk. A leírásra váró fajok mellett az irodalmi adatokból kiindulva, figyelembe véve a *species inquirenda* minősítésű, és a határaink közelében előforduló fajokat további 3-4 faj hazai előfordulására lehet számítani. Az a tény, hogy a valid fajok alacsony száma mellett, a jelen vizsgálat által ennyi, potenciálisan jelen lévő új faj merül fel, jó összhangban van a szubterrán élőhelyek feltáratlanságával, és egyben azt is jelenti, hogy kutatási szempontból jelentős potenciál rejlik a témában.

A magyarországi *Niphargus* fajok rokonsági viszonyainak tisztázásához 11 hazai taxon, és további 96 megfelelő hozzáférhető szekvenciákkal rendelkező taxon bevonásával végeztem Maximum Likelihood (ML), és Bayes-i alapú törzsfaelemzést. Az alacsony támogatottságú elágazások miatt a vizsgálat eredményeiből levonható következtetések korlátozottak. Ennek ellenére a hazai fajok többsége jól definiálható kládokba került. Az egyértelmű elkülönülések alapján a hazai fajok közül a Mecsek barlangjaiban honos *N. molnari* és a Molnár János-barlangban élő *N. sp. nov. 1* és *N. sp. nov. 2.* közös ősré vezethető vissza. A klád további két tagja széles elterjedésű nem karsztos szubterrán élőhelyeken előforduló faj. A *N. hrabei* legközelebbi rokona a Franciaországban honos *N. plateaui*, míg a klád többi faja az Appennini-félszigeten fordul elő. A Kőszegi-hegység rétegvízeiben előforduló *N. valachicus* a vizsgálat eredményei alapján nem sorolható be kládba, így eredetéről és rokonsági viszonyairól nem lehet megállapításokat tenni. A Mecsek barlangjaiban honos *N. gebhardti* egy jól elkülönülő kládot alkot a krim-félszigeti, a romániai és az olasz fajokkal, míg a hozzá legközelebb álló testvérklád tagjai kivétel nélkül szlovéniai fajok. A *N. aggtelekiensis* sokszor megkérdőjelezett önálló faji státusza az eredmények alapján megerősítést nyert. A vele egy kládba került, morfológiai alapokon *N. tatrensis* fajként azonosított bükki populáció taxonómiai státusza és így a faj hazai előfordulása a vizsgálat eredményei alapján továbbra sem tisztázható. A *N. forroi* a morfológiai eltéréseket figyelembe véve kissé

meglepő módon, de meggyőző támogatottsági értékkel szintén az aggtelekiensis-tatrensis klád tagjának mutatkozott. A *N. hungaricus* esetében sem a ML, sem a Bayes-i törzsfák nem mutat megbízható elhelyezkedést és közelrokon fajokat. A továbbra is fennálló bizonytalanságok ellenére kijelenthetjük, hogy a vizsgált hazai *Niphargus* fajok eltérő filogenetikai háttérrel rendelkeznek. Az egyes földrajzi régiók barlangjaiban található fajok is származhatnak külön fejlődési ágakból, mint az látszik például a szimpatrikus előfordulású *N. gebhardti* és *N. molnari* esetében, vagy a Molnár János barlang faunáján. A különböző elágazások molekuláris óra módszerekkel való datálása fontos lenne abból a szempontból, hogy lássuk, az egyes fejlődési ágak kialakulási időpontjai mutatnak-e összefüggést a földtörténeti változásokkal. Az alacsony támogatottsági értékek és az eltérő törzsfaszerkezetek miatt az általam felhasznált adatokkal nincsen lehetőség ilyen jellegű elemzés elvégzésére. A genusz taxonjaira vonatkozó szekvenciák számának folyamatos növekedésével jobb mintavételezés válik lehetővé, amely azonos számú vizsgálatba bevont lókuszok mellett is növeli a törzsfák megbízhatóságát (Heath et al., 2008; Nabhan & Sarkar, 2011). Remélhető tehát, hogy a jövőben a hozzáférhető molekuláris adatok bővülése a megbízhatóbb törzsfák által lehetővé teszi az elágazások időpontjainak elfogadható becslését, valamint általánosságban is segítik a kétes helyzetek feloldását, és a rokonsági viszonyok további tisztázását.

A Molnár János-barlang vizsgálata során megállapítást nyert, hogy hazai viszonylatban kiemelkedően diverz makroszkopikus stygobiont faunával rendelkezik. A barlangban előforduló leírás alatt lévő új *Niphargus* fajok, a *N. sp. nov. 1.* és *N. sp. nov. 2.* a molekuláris vizsgálat alapján a Mecsek barlangjaiban élő *N. molnari*, a Németországban és Franciaországban honos *N. kieferi*, és a Németországtól Szlovákiáig előforduló *N. inopinatus* fajokkal mutatnak rokonságot. A barlangban előforduló a *Bythiospeum* genuszba tartozó csigafaj a genetikai adatok alapján a legutóbbi kiterjedt molekuláris vizsgálat által Clade I.-ként feltüntetett kládba tartozik (Richling et al., 2017). A klád taxonjai között minimális genetikai távolságok vannak. A Clade I. vizsgálatba bevont legrégebben leírt faja a dél-németországi előfordulású *Bythiospeum acicula* (HELD, 1838), amely 99,69%-os egyezést mutat a Molnár János-barlangban élő egyedekkel. Ennek megfelelően a meglehetősen diszjunkt elterjedés ellenére a Molnár János-barlangban élő faj a *B. acicula*.

A barlangban eutroglophile, a vele hidrológiai kapcsolatban lévő Malom-tóban és a Dunában (RSD) epigea populációkkal jelen lévő *N. hrabei*, és az *A. aquaticus* jó fajpárt biztosít kolonizációs és adaptációs vizsgálatok elvégzéséhez. Az élőhelyenként és fajonként 20 egyed bevonásával (a barlangi *N. hrabei* populáció esetében 18), négy génszakasz alapján végeztünk populációgenetikai vizsgálatot. Az eredmények tanúsága szerint az *A. aquaticus* troglomorfozist mutató barlangi populációja genetikailag teljesen elkülönül a felszíni populációktól, közöttük fennálló génáramlásra semmi nem utal. Az eredmények alapján azt feltételezhetjük, hogy a mérsékelt exaptációt mutató faj esetében a barlangi élőhely izolációs tényezőként van jelen, fontos szerepet játszva a genetikai különbségek kialakulásában (*isolation by environment*, IBE). A *N. hrabei* vizsgált populációnak esetében semmilyen populációk szerinti genetikai strukturáltságot nem találtunk. A struktúra hiánya egyaránt magyarázható a faj nagy mértékű exaptációjával, de az élőhely recens kolonizációval is. A genetikai eltérések hiányában nem dönthető el, hogy a faj esetében a távolság szerinti izoláció (*isolation by distance*, IBD), vagy az élőhely szerinti izoláció (IBE) a meghatározó. A molekuláris óra számítások alapján a barlangi és malom-tavi *A. aquaticus* populációk megközelítőleg 60-140 ezer évvel ezelőtt váltak el egymástól. A populációdinamikai modell szerint az *A. aquaticus* esetében jelentős populációméret csökkenés következett be megközelítőleg 100-200 ezer évvel ezelőtt, ami a faj számára kedvezőtlen felszíni körülményekre utal. Az elválási időt figyelembe véve elképzelhető tehát, hogy a barlang klimatikus refúgiumként szolgált a faj számára. A *N. hrabei* esetében az eredmények azt mutatják, hogy jelentős populációméret csökkenés történt, amely mélypontját megközelítőleg 10 ezer évvel ezelőtt érte el, ezt egy mai napig tartó jelentős méretnövekedés követte. Ez az eredmény összhangban van azzal a feltételezéssel, mely szerint a faj recens area expansiót mutat (Copilaş-Ciocianu et al., 2017, 2018).

A látás képességének elvesztése általános eleme a troglomorfizmusnak. A *N. hrabei* és az *A. aquaticus* barlangi egyedei különböző fokát mutatják a barlangi életmódhoz való alkalmazkodásnak, így a fototranszdukciós kaszkádhoz köthető gének expressziós mintázatának vizsgálata közelebb vihet a folyamat megértéséhez. Az általunk elvégzett transzkriptom vizsgálat eredményei szerint az *A. aquaticus* minden populációjánál kimutathatóak a kaszkád főbb elemei, köztük egy rövid hullámhosszra (SWS/UV) érzékeny, és egy hosszú hullámhosszra (LWS) érzékeny opszin is. A faj barlangi

populációja tehát ebből a szempontból nem veszítette el a látás képességét a barlangi életmód ellenére sem, bár a szem egyedenként változó mértékű strukturális degradációt mutat. A *N. hrabei* barlangi és felszíni populációnál szintén kimutathatóak voltak a kaszkád bizonyos elemei beleértve az LWS opszint is. Mivel a fajnál semmilyen szemstruktúra nem található, elképzelhető, hogy az opszin termelés valamiféle extraokuláris fényérzékelésre utal, ahogy azt más fajok esetében már korábban kimutatták (Kelley & Davies, 2016)). A referencia opszinokat való összehasonlítás során azt találtuk, hogy az *A. aquaticus* SWS/UV opszinnál a referencia bovin opszin 90-es pozíciójában lizin reziduális található, mely az opszin UV érzékenységre utal. Az LWS opszin a referencia bovin opszin 292-es pozíciójában az *A. aquaticus* és a *N. hrabei* fajoknál egyaránt alanin helyett szerin reziduálissal rendelkezik, mely más fajoknál kimutatottan megváltoztatta az opszin érzékelési hullámhosszát.

Mivel a Molnár János-barlang sok szempontból kiváló kutatási lehetőségeket rejt magában, az értekezésben ismertetett kutatások eredményei számos vizsgálat alapját képezhetik, melyek egy része már megkezdődött. Az *A. aquaticus* elterjedési területén belül több helyen, és alkalommal kolonizált sikerrel barlangi élőhelyeket. A Molnár János-barlangban élő, ismert genetikai háttérrel rendelkező troglomorf populáció tehát fontos replikátum lehet. A *N. hrabei* azon kevés *Niphargus* fajok közé tartozik, melyek felszíni élőhelyeken fordulnak elő, így a szubterrán élőhelyen megtalált populáció jó lehetőséget biztosít az exaptáció szerepének megértésére irányuló kutatásokhoz. Az *A. aquaticus*, és *N. hrabei* fajok bevonásával végzett jelenleg zajló vizsgálatok során arra vagyunk kíváncsiak, hogy az egyéni és populációs szinten megjelenő viselkedési formák, mint például az aktivitás, az exploráció, vagy egy új táplálékforráshoz való viszonyulás milyen szerepet játszhat a kolonizációs folyamatokban. Szintén fontos jövőbeli kutatási irány annak megértése, hogy a barlang diverz faunáját milyen táplálékforrások tartják fenn. Ez annál is érdekesebb kérdés, mivel a barlangi táplálékhálózatok általában felszíni eredetű szerves anyagokra épülnek, melyek az eddigi eredmények alapján a Molnár János-barlangban nem állnak rendelkezésre.

7. Köszönetnyilvánítás

Mindenek előtt köszönet illeti témavezetőimet Török Jánost és Herczeg Gábort, nemcsak azért mert a témavezetés elvállalásával lehetővé tették munkámat, valamint türelemmel és bizalommal voltak irányomban, hanem azért is mert annak ellenére, hogy témám meglehetősen messze esik kutatási területüktől hathatós segítséget nyújtottak kutatásaim során.

Az általam végzett kutatások egyike sem jöhetett volna létre barlangász barátaim segítségével nélkül. Lehetetlen lenne felsorolni mindazokat, akik a különböző terepi bejárásokon segítettek munkámat. Külön hálával tartozom azonban állandó merülőtársaimnak Lerner Baláznak, Mede Mártonnak, Zsoldos Péternek, Papp Vikornak, Storozynski Szabolcsnak és Brankovits Dávidnak, valamint Irsai Sándornak, aki nélkül nem ismerhettem volna meg a vízalatti barlangok csodálatos világát.

Nagyon hálás vagyok állandó kutatótársaimnak Angyal Dorottyának és Dányi Lászlónak, akik a barlangbiológia elkötelezett híveiként a legképtelenebb helyzetekben, és időpontokban is mindig örömmel tartottak velem.

Hálás vagyok az Aggteleki Nemzeti Park, a Bükki Nemzeti Park, a Duna-Ipoly Nemzeti Park valamint a Duna-Dráva Nemzeti Park munkatársainak a szakmai és engedélyeztetési segítségükért, valamint külön köszönöm Gruber Péternek, Ferenczy Gergőnek és Borzsák Saroltának, hogy minden körülmények között lehetővé tették kutatásaimat. Köszönöm Egri Csabának, és Székely Kingának, hogy helyzettől és időponttól függően szakmai, vagy baráti alapon, de bármikor kérhettem tőlük segítséget, bármilyen barlangokkal kapcsolatos kérdésem merült fel.

Köszönettel tartozom Hosszú Attilának és a Molnár János-barlangban dolgozó többi embernek, hogy merüléseim megtervezésében és kivitelezésében mindig számíthattam rájuk.

Hálás vagyok a Magyar Természettudományi Múzeum vezetőségének, és dolgozóinak, különösen Fehér Zoltánnak, hogy befogadtak maguk közé, és szakmailag és emberileg egyaránt támogatták munkámat.

Köszönöttem tartozom Borza Péternek, és Kriska Györgynek akik a felszíni gyűjtésekben pótolhatatlan segítséget nyújtottak.

Köszönöm a Ljubljana-i Egyetem SubBio laboratóriumát vezető Cene Fišernek, hogy annyi mindenre megtanított. Nélküle esélyem sem lett volna *Niphargus* fajokkal foglalkozni. A laboratórium valamennyi dolgozója sokat segített munkámban, de külön kiemelném Maja Zgmajstert, Teo Delićet, Peter Trontelj-t és Boris Sketet, akik rendkívüli szakmai tudásukkal és emberségükkel mindig hasznossá és kellemessé tették munkámat. Hálával tartozom Valerija Zakšeknek és Spela Borkonak, akik hihetetlenül sokat segítettek a molekuláris adatok létrehozásában és elemzésében.

Köszönöm a floridai Crustacean Genomics and Systematics Lab vezetőjének Heather Brackem-Grissomnak, hogy szakmailag és anyagilag lehetővé tette a Molnár János-barlangban végzett molekuláris kutatásaimat. Hálával tartozom Jorge Luis Pérez-Morenonak, amiért a kezdetektől fogva magáénak érezte kutatásomat, és rendkívül sokat tett azért, hogy elképzeléseim valóra is válhassanak.

Köszönettel tartozom az Állatrendszertani és Ökológiai Tanszék összes dolgozójának, amiért befogadtak és támogattak. Különösen hálás vagyok Dózsa-Farkas Klárának a számtalan inspiráló "barlangos" beszélgetésért, és Horváth Gergelynek, aki szobatársként olthatatlan érdeklődéssel viseltetett az övétől távoli kutatási témám iránt.

Köszönöm a Mikrobiológia Tanszék kutatóinak, Borsodi Andreának, Anda Dórának és Felföldi Tamásnak a pótolhatatlan segítségüket kutatásaim során.

Végül, de nem utolsó sorban végtelenül hálás vagyok szűkebb és tágabb értelemben vett családomnak, hogy bár többszöri próbálkozásaim ellenére sem gondolom, hogy tudják pontosan mivel is foglalkozom, mégis mindig mindenben feltétel nélkül támogattak.

Összefoglalás

A barlangbiológia legfontosabb aktuális kérdései közé tartozik a barlangi élőhelyek kolonizációja és a barlangi környezethez való adaptáció mögött rejlő folyamatok megértése. A *Niphargus* genusz több száz változatos szubterrán fajával általánosságban véve az egyik legígéretesebb modelltaxon a kérdések vizsgálatára. mindezek mellett a szubterrán életmódra való áttérés kezdeti lépései a genusz esetében olyan régen zajlottak le, hogy azokról vizsgálatunkkal nem juthatunk releváns információkhoz. A kezdeti kolonizációs és adaptációs lépések megértéséhez az eredendően felszíni életmódú, de számtalan független kialakulású barlangi populációval rendelkező közönséges víziászka (*Asellus aquaticus*) kínál lehetőséget.

Megfelelő taxonómiai háttér nélkül bármilyen vizsgálat könnyen hibás következtetések levonásához vezethet, ezért kutatásaim első lépéseként a hazai *Niphargus* fajok helyzetét kellett tisztáznom. Az irodalmi említések között szereplő 27 faj közül mindössze 8 valid faj tekinthető bizonyítottan a magyar fauna részének, míg a többi különböző okok miatt kizárásra került.

Hazai valid *Niphargus* fajok: *Niphargus hrabei* S. KARAMAN, 1932; *Niphargus valachicus* DOBREANU & MANOLACHE, 1933; *Niphargus hungaricus* MÉHELÛ 1937; *Niphargus gebhardti* SCHELLENBERG, 1934; *Niphargus molnari* MÉHELÛ 1927; *Niphargus aggtelekiensis* DUDICH, 1932; *Niphargus tatrensis* (WRZESNIOWSKY, 1890); *Niphargus forroi* G. KARAMAN, 1986.

Az országhatárok módosulása miatt kizárt *Niphargus* fajok: *Niphargus dudichi* HANKÓ, 1924; *Niphargus baloghi* DUDICH, 1940; *Niphargus pater* MÉHELÛ, 1941; *Niphargus effusus* DUDICH, 1943; *Niphargus korosensis* DUDICH, 1943; *Niphargus stygocharis stygocharis* DUDICH, 1943

Téves határozás vagy taxonómiai változás miatt kizárt *Niphargus* fajok: *Niphargus stygius* (SCHIÖDTE, 1847); *Niphargus longicaudatus* (A. COSTA, 1851), *Niphargus puteanus* (C. L. KOCH, 1836); *Niphargus foreli* HUMBERT, 1876; *Niphargus leopoliensis* JAWOROWSKY, 1893; *Niphargus mediodanubialis* DUDICH, 1941, *Niphargus thermalis* DUDICH, 1941

Kétséges fajok (*species inquirenda*): *Niphargus magyaricus* MÉHELY, 1941; *Niphargus matrensis* MÉHELY, 1941; *Niphargus beldyi* MÉHELY, 1941; *Niphargus budensis* MÉHELY, 1941; *Niphargus ginsiensis* MÉHELY, 1941; *Niphargus parvus* MÉHELY, 1941

A felsorolt fajok közül a *N. mediodanubialis* fajt egyes szerzők morfológiai megfontolások alapján a *N. valachicus* junior szinonimájának tekintették. Ezt a vélekedést az általunk végzett genetikai vizsgálat adatai is megerősítették. A *N. thermalis* az általunk végzett morfológiai és genetikai vizsgálatok alapján a *N. hrabei* junior szinonimája.

Az intenzív terepi munkának köszönhetően a Molnár János-barlangból kettő, míg a Visegrádi-hegység területéről további egy leírás alatt álló tudományra nézve új *Niphargus* faj került elő.

A 11 hazai és további 95 külföldi *Niphargus* taxonon alapuló filogenetikai vizsgálatunk alapján a Molnár János-barlangban előforduló két faj és a Mecsek barlangjaiban honos *N. molnari*, valamint a nyugat- és közép-európai elterjedésű *N. kieferi* és *N. inopinatus* fajok egy kládba tartoznak. A *N. hrabei* legközelebbi rokona az eredmények alapján a franciaországi előfordulású *N. plateaui*. Ebbe a kládba ezeken kívül az Appennini-félszigeten honos *N. costozzae*, *N. montanarius* és *N. montellianus* fajok tartoznak. A mintázat alapján valószínűsíthető a *N. hrabei* mediterrán eredete. A *N. gebhardti* fajt tartalmazó kládban a hazai fajon kívül krim-félszigeti (*N. dimorphus*, *N. vadimi*), romániai (*N. bihorensis*) és olasz (*N. ambulator*) fajok tartoznak. A legközelebb álló testvérklád tagjai kivétel nélkül szlovéniai fajok (*N. carniolicus*, *N. wolfi*, *N. fongi*, *N. dobati*). Mivel a többi elemzésbe bevont kelet-európai faj más kládokba tartozik, feltételezhetjük, hogy a *N. gebhardti* fajt magába foglaló klád valahonnan a Dinári-hegység északi részéről származhat. A régóta vitatott státuszú *N. aggtelekiensis* hazai populációinak faji rangja megerősítést nyert a filogenetikai vizsgálat által, míg a morfológiai alapon a fajhoz sorolt ausztriai populációk a genetikai eredmények alapján nem tartoznak a fajhoz. A Bükk barlangjaiban honos morfológiai alapon *N. tatrensis* fajhoz sorolt populáció taxonómiai helyzetét a genetikai vizsgálat nem tudta tisztázni. A szintén a Bükkben előforduló *N. forroi* a „tatrensis”-csoport többi fájával (*N. tatrensis*, *N. aggtelekiensis*, *N. scopicauda*) egy kládba került, de azoktól egyértelmű elkülönülést mutat. A *N. valachicus* és *N. hungaricus* fajok esetében a filogenetikai vizsgálat nem hozott eredményt a rokonsági viszonyok tekintetében.

A Molnár János-barlangban végzett vizsgálatok alapján megállapítottam, hogy a két tudományra nézve új *Niphargus* faj mellett a barlangban további három makroszkopikus gerinctelen faj fordul elő. A *Bythiospeum* genuszba tartozó csigafaj a COI alapú genetikai vizsgálat alapján a dél-németországi előfordulási adatokkal rendelkező *B. acicula*.

A barlangban eutroglophile populációkkal jelen lévő *N. hrabei* és *A. aquaticus* fajokon és azok felszíni populációin (Malom-tó, Ráckevei-Soroksári Duna-ág) végzett populációgenetikai és filogeográfiai vizsgálatok tanúsága szerint, a jelentős exaptációt mutató *N. hrabei* felszíni és barlangi populációi között nem tapasztalható genetikai strukturáltság, míg az *A. aquaticus* esetében a barlangi populáció egyértelmű elkülönülést mutat. A *N. hrabei* esetében a struktúra teljes hiányára kétféle magyarázat is kínálkozik. Az egyik szerint a nagymértékű exaptáció miatt a barlangi élőhely nem jelent barriert, míg a másik alapján a recens kolonizáció miatt nem alakultak ki az általunk alkalmazott módszerekkel kimutatható genetikai különbségek. Annak eldöntése, hogy melyik magyarázat igaz az általunk használt módszerekkel pont a struktúra hiánya miatt nem lehetséges.

Az egyértelmű elkülönülést mutató barlangi *A. aquaticus* populáció esetében az eredmények alapján feltételezhetjük, hogy a mérsékelt exaptációt mutató faj számára a barlangi élőhely izolációs tényezőként van jelen.

A molekuláris óra alapú számításaink alapján a barlangi és malom-tavi populációk szétválása megközelítőleg 60-140 ezer évvel következett be. Amennyiben ehhez hozzávesszük, hogy számításaink szerint az *A. aquaticus* megközelítőleg 100-200 ezer évvel ezelőtt jelentős populációméret csökkenésen ment keresztül, akkor feltételezhetjük, hogy a barlang klimatikus refúgiumként szolgált. A barlangi populáció egyedei filogenetikai kontextusban értelmezve a határozott elkülönülés ellenére az *A. aquaticus* fajhoz tartoznak.

A *N. hrabei* és *A. aquaticus* populációkon végzett transzkriptom vizsgálatnál a felszíni és barlangi populációk között nem mutatkozott számottevő különbség a fototranszdukciós kaszkád elemeinek tekintetében. A *N. hrabei* esetében a genusz szubterrán eredetének ellenére a fototranszdukciós kaszkád több eleme kimutatható volt mind a barlangi, mind a felszíni populációk esetében beleértve egy hosszú hullámhosszra érzékeny opszint (LWS) is. A kaszkád elemeinek jelenléte azt feltételezi, hogy a faj képes lehet valamiféle extraokuláris fényérzékelésre.

A fototranszdukciós kaszkád összes lényeges eleme kimutatható volt az *A. aquaticus* mindhárom vizsgált populációnál, beleértve egy rövid hullámhosszra (SWS/UV) érzékeny és egy hosszú hullámhosszra érzékeny (LWS) opszint is. Az eredmények alapján feltételezhetjük, hogy a barlangi *A. aquaticus* populáció egyedei csökevényes látószervük ellenére képesek a fényérzékelésre. A bovin referencia opszinnal való összehasonlítás során azt találtuk, hogy az *A. aquaticus* SWS/UV opszin 90-es referenciapozíciójában lizin reziduális található, mely az opszin UV érzékenysége utal. A LWS opszinok esetében mindkét fajnál a 292-es referenciapozícióban alanin helyett szerin reziduális található, mely eltérés képes megváltoztatni az opszin érzékelési tartományát. Az általunk elvégzett transzkriptom vizsgálat kvalitatív jellegű volt, így az expresszió szabályozásáról semmilyen információval nem szolgált.

Summary

The underlying mechanisms and processes that prompt the colonisation and adaptation of the subterranean environment constitute major research themes of evolutionary biology and cave biology. The genus *Niphargus* with hundreds of diverse subterranean species is a good model candidate for investigations. Yet as it is a long-time subterranean taxon, the traces of its early stages of cave colonisation and adaptation are most likely undetectable. The most promising arthropod species through which to investigate those early stages is the waterlouse (*Asellus aquaticus*), which has repeatedly and successfully colonised caves throughout its geographical range.

Without proper taxonomic knowledge, there is a greater chance to draw false conclusions. Therefore, as a first step of my investigations, I intended to clarify the taxonomical status of the Hungarian *Niphargus* species from which to form a solid background. Out of the 27 *Niphargus* species mentioned with Hungarian occurrence in the relevant literature only eight species proved to be valid and present in the Hungarian fauna while the rest had to be excluded for various reasons.

Currently valid indigenous *Niphargus* species: *Niphargus hrabei* S. KARAMAN, 1932; *Niphargus valachicus* DOBREANU & MANOLACHE, 1933; *Niphargus hungaricus* MÉHELÝ 1937; *Niphargus gebhardti* SCHELLENBERG, 1934; *Niphargus molnari* MÉHELÝ 1927; *Niphargus aggtelekiensis* DUDICH, 1932; *Niphargus tatrensis* (WRZESNIOWSKY, 1890); *Niphargus forroi* G. KARAMAN, 1986.

Species excluded due to international border changes: *Niphargus dudichi* HANKÓ, 1924; *Niphargus baloghi* DUDICH, 1940; *Niphargus pater* MÉHELÝ, 1941; *Niphargus effosus* DUDICH, 1943; *Niphargus korosensis* DUDICH, 1943; *Niphargus stygocharis stygocharis* DUDICH, 1943

Species excluded due to misidentifications and taxonomical changes: *Niphargus stygius* (SCHIÖDTE, 1847); *Niphargus longicaudatus* (A. COSTA, 1851), *Niphargus puteanus* (C. L. KOCH, 1836); *Niphargus foreli* HUMBERT, 1876; *Niphargus leopoliensis* JAWOROWSKY, 1893; *Niphargus mediodanubialis* DUDICH, 1941, *Niphargus thermalis* DUDICH, 1941

Niphargus species with uncertain taxonomic status (*species inquirenda*): *Niphargus magyaricus* MÉHELÝ, 1941; *Niphargus matrensis* MÉHELÝ, 1941; *Niphargus beldyi*

MÉHELÿ, 1941; *Niphargus budensis* MÉHELÿ, 1941; *Niphargus ginsiensis* MÉHELÿ, 1941; *Niphargus parvus* MÉHELÿ, 1941

Amongst the above listed species, *N. mediodanubialis* has been mentioned as a junior synonym of *N. valachicus* based on morphological similarities. This suggestion is further strengthened by our molecular results. According to our morphological and genetic results, *N. thermalis* is undoubtedly a junior synonym of *N. hrabei*.

As a result of our extensive field research, two new species from Molnár János Cave, and one from the Visegrád Mountains were found; all three yet to be described.

According to the results of our phylogenetic investigation including 11 Hungarian and 95 other *Niphargus* taxa, *N. molnari*, which is an endemic species of the caves of the Mecsek Mountains, and the two new species from Molnár János Cave are forming a clade together with the Western- and Central European *N. kieferi* and *N. inopinatus*. The closest relative of the epigean *N. hrabei* appears to be the *N. plateaui* with French distribution, while the rest of the members of this clade are species from the Apennine Peninsula, namely *N. costozzae*, *N. montanarius* and *N. montellianus*. This pattern suggests the possible Mediterranean origin of *N. hrabei*. The *N. gebhardti* forming a well-defined clade with species from the Crimean Peninsula (*N. dimorphus*, *N. vadimi*), Romania (*N. bihorensis*) and Italy (*N. ambulator*). As the sister clade only contains Slovenian species (*N. carniolicus*, *N. wolffi*, *N. fongi*, *N. dobati*), and the other examined Eastern-European species fall into distinct clades, we can assume that the clade containing *N. hrabei* is of Northern-Dinaric origin. The repeatedly questioned species rank of the Hungarian populations of *N. aggtelekiensis* is strengthened by our phylogenetical results, while the morphologically identified Austrian populations do not belong to the species. The species inhabiting the caves of the Bükk Mountains were identified as *N. tatrensis*, based on morphology. This identification was not clearly strengthened by our results, therefore the occurrence of *N. tatrensis* in Hungary remains somewhat questionable. The *N. forroi* which also occurs in caves of the Bükk Mountains, belongs to the same clade as the rest of the 'tatrensis'-group (*N. tatrensis*, *N. aggtelekiensis*, *N. scopicauda*), yet shows clear separation. In the cases of *N. valachicus* and *N. hungaricus*, our phylogenetic investigation failed to detect their true relationship with other species.

The research of the fauna of the Molnár János Cave showed that besides the two new *Niphargus* species, three other macroinvertebrate species can be found. According to COI based genetic data, the *Bythiospeum* snail species of the cave is identical to *B. acicula* which is known from Southern Germany.

The *N. hrabei* and the *A. aquaticus* species are represented in the cave by eutrogophile populations, while they also have epigean populations in hydrologically-connected surface habitats (Malom Lake, Ráckeve-Soroksár Danube). According to our population genetic and phylogeographic investigation, the cave-exapted *N. hrabei* cave population showed no separation from the adjacent surface populations, while in the case of the moderately exapted *A. aquaticus*, the cave population is genetically clearly separated from the epigean ones. The lack of genetic structure at the *N. hrabei* populations can be equally explained by two different assumptions. It is possible that the subterranean environments do not pose a barrier for this species, therefore the gene flow is permanent. On the other hand, it is also plausible that the presence of the cave species is as a result of a recent colonisation, in which case the separation is undetectable by the methods we applied. Based on our results it is impossible to tell which explanation is the most likely, as there is no relevant information in the lack of structure assisting such a conclusion.

As the separation of the hypogean *A. aquaticus* population is clear, we can assume that for the less exapted species the cave environment represents isolation. According to our molecular clock estimations, the separation between the cave and the Malom Lake population occurred approximately 60 k to 140 k years ago. This result taken together with a calculated significant reduction in population size approximately 100 k to 200 k years ago, leads to the conclusion that the cave might have served as a climatic refugium for the species. Despite the differentiation, the Molnár János Cave population still falls within the species range for *A. aquaticus* in a phylogenetic context.

The transcriptome investigation carried out on the same *N. hrabei* and *A. aquaticus* populations aiming to detect expressed elements of the phototransduction cascade, revealed no significant differences between the sampled individuals. Despite the subterranean origin of its genus, some elements of the cascade, including a long wavelength sensitive (LWS) opsin, were present in all *N. hrabei* populations. Taking into account the expression of cascade elements, the possibility of extraocular

photoreception cannot be discarded. All the important elements of the phototransduction cascade were present in both hypogean and epigean populations of *A. aquaticus* including a short wavelength sensitive (SWS/UV) and a long wavelength sensitive (LWS) opsin. The results suggest that despite the aphotic habitat, individuals of the hypogean population might retain the ability to detect light despite their reduced eyes. Comparing the opsins with a bovine reference sequence, we found that the opsin annotated as SWS/UV opsin for *A. aquaticus*, contains lysine residue in the reference position 90, supporting its putative UV sensitivity. Both species show a serine residue at reference position 292 instead of an alanine in LSW sequences, which difference can shift the spectral sensitivity of the opsin. As our study only gave results of a quantitative nature, it does not provide information regarding the regulation of the expression.

Irodalomjegyzék

- Agassiz, L. (1851). Observations on the blind fish of the Mammoth cave. *American Journal of Science*, 11, 127–8.
- Agassiz, L. (1859). *An Essay on Classification*. London: Longman, Brown, Green, Longmans & Roberts.
- Allegrucci, G., Todisco, V. & Sbordoni, V. (2005). Molecular phylogeography of Dolichopoda cave crickets (Orthoptera, Rhaphidophoridae): A scenario suggested by mitochondrial DNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 37, 153–64.
- Alberti, L. (1550). *Descrittione di tutta Italia*. Bologna: Anselmo Giaccarelli.
- Anda, D., Makk, J., Krett, G., Jurecska, L., Márialigeti, K., Mádl-Szőnyi, J. & Borsodi, A. (2015). Thermophilic prokaryotic communities inhabiting the biofilm and well water of a thermal karst system located in Budapest (Hungary). *Extremophiles* 19, 787–97.
- Andrássy, I. (1956). *Troglochaetus beranecki* Del. ein Representant für den Fauna Ungarns, neue Tierklasse Archiannelida. *Annales Historico-Naturales Musei Nationalis Hungarici*, 7, 371–5.
- Andrássy, I. (1959a). Nematoden aus der Tropfsteinhöhle "Baradla" bei Aggtelek (Ungarn), nebst einer Übersicht der bisher aus Höhlen bekannten freilebenden Nematoden-Arten. *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 4(3–4), 253–77.
- Andrássy, I. (1959b). Weitere Nematoden aus den Tropfsteinhöhle "Baradla". *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 5(1–2), 1–6.
- Andrássy, I. (1961). Neue und seltene Arten der Familie Alaimidae (Nematoda). *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 7, 1–18.
- Andrássy, I. (1963). Nematologische Notizen, 12. *Annales Universitatis Scientiarum Budapestiensis de Rolando Eötvös Nominatae: Sectio Biologica*, 6, 3–12.
- Andrássy, I. (1964). Neue Nematoden-Arten aus Ungarn, III. Fünf neue Arten. *Opuscula Zoologica (Budapest)*, 5, 9–23.
- Andrássy, I. (1967). Die Unterfamilie Cephalobinae (Nematoda: Cephalobidae) und ihre Arten. *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 13, 1–37.

- Andrássy, I. (1977). Die Gattungen *Amphidelus* Thorne, 1939, *Paramphidelus* n. gen. und *Etamphidelus* n. gen. (Nematoda: Alaimidae). *Opuscula Zoologica (Budapest)*, 14, 2–43.
- Andrássy, I. (1981). Revision of the order Monhysterida (Nematoda) inhabiting soil and inland waters. *Opuscula Zoologica (Budapest)*, 17–18, 13–47.
- Andrews, S. (2010). FastQC—a quality control tool for high throughput sequence data. (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>).
- Angyal, D. (2012a). Újabb adatok a magyar vakcsiga (*Bythiospeum hungaricum* (Soós, 1927); Gastropoda, Hydrobiidae) elterjedéséről az élőhelyében bekövetkezett változások tükrében. *Állattani Közlemények*, 97(2), 163–70.
- Angyal, D. (2012b). Invertebrate fauna of the Mánfai-Kőlyuk Cave (Mecsek, SW Hungary) in the light of utilization by waterworks. *Természettudományi Közlemények*, 18, 24–33.
- Angyal, D. (2015). Integrative taxonomic revision of *Niphargus* spp. and other rare and endemic troglobiont macroinvertebrates from the caves of the Western Mecsek Mts (South Hungary). PhD Thesis, *University of Pannonia, Georgikon Faculty, Keszthely*, 136 pp.
- Angyal, D. & G. Balázs (2013a). New data to the distribution of four aquatic troglobiont macroinvertebrate species in some caves of the Mecsek Mountains (SW Hungary). In: M. Filippi & Bosák P. (Eds). *Proceedings of the 16th Congress on Speleology, Brno, Czech Republic, vol. 2*, 426–9.
- Angyal, D. & Balázs, G. (2013b). Distinguishing characters of *Niphargus gebhardtii* Schellenberg, 1934 and *Niphargus molnari* Méhelý, 1927 (Crustacea: Amphipoda): a clarification. *Opuscula Zoologica, Budapest*, 44(1), 3–8.
- Angyal, D. & Korsós Z. (2013). Millipedes (Diplopoda) of twelve caves in Western Mecsek, South-west Hungary. *Opuscula Zoologica (Budapest)*, 44(2), 85–106.
- Angyal, D., Krízsis, V. & Fehér Z. (2013). Magyar vakcsiga (*Bythiospeum hungaricum* (Soós, 1927)) – egy szisztematikai probléma vizsgálata genetikai módszerekkel. *Mecsek Sopianicum*. http://www.mecsek.gportal.hu/portal/mecsek/upload/338424_1373482703_01499.pdf

- Angyal D., Balázs G., Zakšek V., Krízsik V. & Fišer C. (2015). Redescription of two subterranean amphipods *Niphargus molnari* Méhely, 1927 and *Niphargus gebhardti* Schellenberg, 1934 (Amphipoda, Niphargidae) and their phylogenetic position. *ZooKeys*, 509, 53–85.
- Angyal, D., Balázs, G., Krízsik, V., Herczeg, G. & Fehér, Z. (2018). Molecular and morphological divergence in a stygobiont gastropod lineage (Truncatelloidea, Moitessieriidae, Paladilhiosis) within an isolated karstic area in the Mecsek Mountains (Hungary). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 56, 493–504.
- Anisimova, M., Gil, M., Ois Dufayard, J-F., Dessimoz, C. & Gascuel, O. (2011). Survey of branch support methods demonstrates accuracy, power, and robustness of fast likelihood-based approximation schemes. *Systematic Biology*, 60(5), 685–99.
- Ács, A. & Kontschán J. (2014). Contribution to the *Macrochelidae* Vitzthum, 1930 fauna of the Carpathian Basin and the Balkan Peninsula (Acari: Mesostigmata). *Opuscula Zoologica (Budapest)*, 45(2), 109–18.
- Bajomi, D. (1969a). A Meteor-barlang faunisztikai vizsgálata. *Karszt és Barlang*, 2, 61–4.
- Bajomi, D. (1969b). Examen fantastique de la grotte „Meteor” (Hongrie) (Biospeleologica hungarica XXIX.). *Opuscula Zoologica (Budapest)*, 9(2), 235–47.
- Bajomi, D. (1977a). A review of the fauna of Hungarian caves. *Proceedings of the 7th International Speleological Congress, England*, 35–8.
- Bajomi, D. (1977b). Áttekintés a magyarországi barlangok faunájáról. *Karszt és Barlang*, 17(1–2), 3–28.
- Balázs, G. & Angyal, D. (2013). A magyarországi vakbolharákfajok (Amphipoda: *Niphargus*) kiértékelő irodalmi áttekintése. *Állattani Közlemények*, 98(1–2), 111–9.
- Balázs G., Angyal D. & Kondorosy E. (2015). *Niphargus* (Crustacea: Amphipoda) species in Hungary: literature review, current taxonomy and the updated distribution of valid taxa. *Zootaxa*, 3974(3), 361–76.
- Banta, A. M. (1907). *The fauna of Mayfield's Cave*. Carnegie Institution of Washington Publications, 67, 114 pp.
- Barnard, J. L. & Karaman, G. S. (1991). *The families and genera of marine gammaridean Amphipoda (except marine gammaroids)*. Records of the Australian Museum, 13, 417 pp.

- Barr, T. C. (1968). Cave ecology and the evolution of troglobites. *Evolutionary Biology*, 2, 35–102.
- Barr, T. C. & Holsinger, J. R. (1985). Speciation in Cave Faunas. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 16, 313–37.
- Bate, C. S. (1859). On the genus *Niphargus* (Schiödte). *Proceedings of the Dublin University Zoological and Botanical Association*, 1, 237–40.
- Berczik, Á. (1956). Újabb hidrobiológiai vizsgálatok a Lukács gyógyfürdő Malom-taván. *Állattani Közlemények*, 45, 35–44.
- Berczik, Á. (1966). Über die Wasserfauna im Anland des Ungarischen Donauabschnittes (Danubialia Hungarica XXXV). *Opuscula Zoologica, Budapest*, 6(1), 79–91.
- Berczik, Á. (1968). Chironomidenlarven aus einer nordungarischen Tropfsteinhöhle (Biospeleologica hungarica, XXVIII). *Opuscula Zoologica (Budapest)*, 8(2), 347–50.
- Bishop, R. E., Iliffe, T. M. (2009). Metabolic rates of stygobiontic invertebrates from the Túnel de la Atlántida, Lanzarote. *Marine Biodiversity*, 39, 189–94.
- Bokor, E. (1921). A magyarhoni barlangok ízeltlábúi. Die Arthropoden der ungarischen Grotten. *Barlangkutatás*, 9, 1–22, 45–9.
- Bokor, E. (1924). Beiträge zur rezenten Fauna der Abaligeter Höhle. *Zoologischer Anzeiger*, 61, 111–21.
- Bokor, E. (1925). Az Abaligeti-barlang. *Földrajzi Közlemények*, 53(6–8), 105–40.
- Bokor, E. (1926). Új Duvalites Magyarországból. *Annales Historico-Naturales Musei Nationalis Hungarici*, 24, 40–8.
- Boldogh, S. & P. Estók (Eds.) (2007). *Földalatti denevérszállások katasztere I. (Catalogue of underground bat roosts of Hungary I.)* ANP Füzetek III., Aggteleki Nemzeti Park Igazgatóság, Jósvalő, 340 pp.
- Bolger, A.M., Lohse, M. & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30, 2114–20.
- Borowsky, B. (2011). Responses to light in two eyeless cave dwelling amphipods (*Niphargus ictus* and *Niphargus frassianus*). *Journal of Crustacean Biology*, 31, 613–6.
- Borsodi, A. K., Knáb, M., Krett, G., Makk, J., Márialigeti, K., Erőss, A. & Mádl-Szőnyi, J. (2012). Biofilm Bacterial Communities Inhabiting the Cave Walls of the Buda Thermal Karst System, Hungary. *Geomicrobiology Journal*, 29(7), 611–27.

- Borza P., Nosek, J. & Oertel, N. (2010). Contribution to the macroinvertebrate fauna of the Hungarian Danube. V. Amphipods (Crustacea: Malacostraca: Amphipoda) *Folia Historico Naturalia Musei Matrensis*, 34, 17–27.
- Borza, P., Cser, B., Czirok, A., Deák, Cs., Ficsór, M., Horvai, V., Horváth, Zs., Kovács, K., Petri, A. & Vad, Cs. (2013). Adatok a síkvidéki felszíni *Niphargus*-fajok (Crustacea, Amphipoda, Niphargidae) magyarországi elterjedéséhez. X. *Makroszkópikus Vízi Gerinctelenek Kutatási Konferencia, Szalafő, absztrakt kötet*, p. 21.
- Bracken, H. D., De Grave, S., Toon, A., Felder, D. L. & Crandall, K. A. (2010). Phylogenetic position, systematic status, and divergence time of the Procarididea (Crustacea: Decapoda). *Zoologica Scripta*, 39, 198–212.
- Bracken, H., Grave, S. D. & Felder, D. (2009). Phylogeny of the infraorder Caridea based on mitochondrial and nuclear genes (Crustacea: Decapoda). In: Martin, J., Crandall, K. & Felder, D. L., (Eds.). *Decapod Crustacean Phylogenetics*. Boca Raton: Taylor and Francis/CRC Press, 274–98.
- Bracken-Grissom, H. D., Enders, T., Jara, C. G. & Crandall, K. A. (2011). Molecular diversity of two freshwater anomuran crab species in Southern Chile (Decapoda: Anomura: Aeglidae) compared to associated morphometric differences. In: Held, C., Schubart, C., Koenemann, S., (Eds.) *Phylogeography and population genetics in Crustacea*. Boca Raton: Taylor and Francis/CRC Press, 305–22.
- Bracken-Grissom, H. D., Cannon, M. E., Cabezas, P., Feldmann, R. M., Schweitzer, C. E., Ah Yong, S. T., Felder, D. L., Lemaitre, R. & Crandall, K. A. (2013). A comprehensive and integrative reconstruction of evolutionary history for Anomura (Crustacea: Decapoda). *BMC Evolutionary Biology*, 13, 128–128.
- Bryson, R. W. J., Prendini, L., Savary, W. E. & Pearman, P. B. (2014). Caves as microrefugia: Pleistocene phylogeography of the troglomorphic North American scorpion *Pseudouroctonus reddelli*. *BMC Evolutionary Biology*, 14(1), 9.
- Bybee, S. M., Bracken-Grissom, H. D., Hermansen, R. A., Clement, M. J., Crandall, K. A. & Felder, D. L. (2011). Directed next generation sequencing for phylogenetics: An example using Decapoda (Crustacea). *Zoologischer Anzeiger - A Journal of Comparative Zoology*, 250, 497–506.
- Caccone, A. & Sbordoni, V. (2001). Molecular biogeography of cave life: a study using mitochondrial DNA from bathysciine beetles. *Evolution*, 55, 122–30.

- Camacho, A. I. (2006). An annotated checklist of the Syncarida (Crustacea, Malacostraca) of the world. *Zootaxa*, 1374, 1–54.
- Cărașu, S., Doboreanu, E. & Manolache, C. (1955). Amphipoda, *Fauna Rominiei*, Ed. *Academia Române*, 4, 310–311.
- Carlini, D. B, Satish, S. & Fong, D. W. (2013). Parallel reduction in expression, but no loss of functional constraint, in two opsin paralogs within cave populations of *Gammarus minus* (Crustacea: Amphipoda). *BMC Evolutionary Biology*, 13(1), 89.
- Chappuis, P. A. (1944). A Körös és a Szamos talajvízfaunája - Die Grundwasserfauna der Körös und des Szamos. *Mathematikai és Természettudományi Közlemények*, 15(2), 1–43.
- Chevaldonné, P., Sket, B., Marschal, C., Lejeusne, C. & Calado, R. (2008). Improvements to the “Sket bottle”: a simple manual device for sampling small crustaceans from marine caves and other cryptic habitats. *Journal of Crustacean Biology*, 28(1), 185–8.
- Christiansen, K. (1961). Convergence and Parallelism in Cave Entomobryinae, *Evolution*, 15(3), 288–301.
- Christiansen K. (1962). Proposition pour la classification des animaux cavernicoles. *Spelunca*, 2, 75–8.
- Christiansen, K. (1965). Behavior and form in the evolution of cave Collembola. *Evolution*. 19, 529–37.
- Christman, M. C. & Culver, D. C. (2001). The relationship between cave biodiversity and available habitat. *Journal of Biogeography*, 28, 367–80.
- Christman, M. C., Culver, D. C., Madden, M. K. & White, D. (2005). Patterns of endemism of the eastern North America cave fauna. *Journal of Biogeography*, 32, 1441–52.
- Csiki, E. (1903). Magyarországi új bogarak (Coleoptera nova ex Hungaria). *Annales historico-naturales Musei nationalis hungarici*, 1, 441–6.
- Colgan, D.J., Ponder, W. F. & Eggler, P. E. (2000). Gastropod evolutionary rates and phylogenetic relationships assessed using partial 28S rDNA and histone H3 sequences. *Zoologica Scripta*, 29(1), 29–63.
- Cooper, S. J. B., Hinze, S., Leys, R., Watts, C. H. S. & Humphreys, W. F.(2002). Islands under the desert: Molecular systematics and evolutionary origins of stygobitic water beetles (Coleoptera:Dytiscidae) from central Western Australia. *Invertebrate Systematics*, 16, 589–98.

- Copilaş-Ciocianu, D., Fišer, C., Borza, P., Balázs, G., Angyal, D. & Petrusek, A. (2017). Low intraspecific genetic divergence and weak niche differentiation despite wide ranges and extensive sympatry in two epigeal *Niphargus* species (Crustacea: Amphipoda). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 181, 485–99.
- Copilaş-Ciocianu, D., Fišer, C., Borza, P. & Petrusek, A. (2018). Is subterranean lifestyle reversible? Independent and recent large-scale dispersal into surface waters by two species of the groundwater amphipod genus *Niphargus*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 119, 37–49.
- Costa, A. (1851). In: Hope, F., W. *Catalogo Dei Crostacei Italiani E Di Molti Altri Del Mediterraneo*. Naples, 23 pp.
- Costa, A. (1857). Ricerche sui crostacei Amfipodi del regno di Napoli. *Memorie della Reale Accademia de Scienze di Napoli*, 165–235.
- Cronin, T. W. & Porter, M. L. (2014). The evolution of invertebrate photopigments and photoreceptors. In: Hunt D, Hankins M, Collin S, Marshall N, (Eds.). *Evolution of visual and nonvisual pigments*. Vol. 4. Boston (MA): Springer. p. 105–35.
- Culver, D. C. & Sket, B. (2000). Hotspots of subterranean biodiversity in caves and wells. *Journal of Cave and Karst Studies*, 62, 11–17.
- Culver, D. C., Christman, M. C., Elliott, W. R., Hobbs, H. H. & Reddell, J. L. (2003). The North American obligate cave fauna: regional patterns. *Biodiversity and Conservation*, 12, 441–68.
- Culver, D. C., Christman, M. C., Šereg, I., Trontelj, P. & Sket, B. (2004). The location of terrestrial species-rich caves in a cave-rich area. *Subterranean Biology*, 2, 27–32.
- Culver, D.C. & Pipan, T. (2009). *Biology of Caves and Other Subterranean Habitats*. Oxford University Press, Oxford. 254 pp.
- Culver, D. C., Pipan, T. & Schneider, K. (2009). Vicariance, dispersal and scale in the aquatic subterranean fauna of karst regions. *Freshwater Biology*, 54, 918–29.
- Cummings, M. P., Neel, M. C. & Shaw, K. L. (2008). A genealogical approach to quantifying lineage divergence. *Evolution; international journal of organic evolution*, 62, 2411–22.
- Daday, J. (1884). *Catalogus crustaceorum faunae Transylvaniae*. E collectione Musei transylvanici – Névjegyzéke az erdélyi orsz. muzeum gyűjteményében levő erdélyi

- héjasoknak. *Orvos-természettudományi értesítő II. Természettudományi szak*, 9[6](2), 161–87.
- Daday, J. (1889). *A magyarországi Myriapodák magánrajza*. Kir. M. Természettud. Társ., Budapest, 126 pp.
- Danielopol, D. L. & Rouch, R. (2005). Invasion, active versus passive. In: D.C. Culver & W.B. White, eds. *Encyclopedia of caves*, Elsevier/Academic Press, Amsterdam, The Netherlands, pp. 305–310.
- Dányi, L. (2011). Cave dwelling springtails (Collembola) of Hungary: a review. *Soil Organisms*, 83(3), 419–32.
- Darányi, F. (1966a). Karst hydrology of the Bakony. *Hidrologiai Közlöny*, 46(5), 211–8.
- Darányi, F. (1966b). The structure of the Bakony (Adatok a Bakony hegység szerkezetéhez). *Földtani Közlemények*, 96, 280–91.
- Darányi, F. (1972). Karst of Hungary. In: M. Herak & V. T. Springfield (Eds.) *Important karst regions of the Northern Hemisphere*. Elsevier. pp. 267–295
- Darwin, C. (1859). *On the origin of species by means of natural selection, or the preservation of favoured races in the struggle for life*. 1st edn. John Murray, London.
- Decu, V., Juberthie, C. & Nazareanu, G. (2018) Subterranean biota of the European part of Russia: A review. *Invertebrate Zoology*. 15(2), 153–213.
- Delić, T., Trontelj, P., Zakšek, V. & Fišer, C. (2016). Biotic and abiotic determinants of appendage length evolution in a cave amphipod. *Journal of Zool*, 299, 42–50.
- Dénes, Gy. (1977). The caves of Hungary. *Karszt és Barlang, special issue*, 19–26.
- Deharveng, L. & Bedos, A. (2000). The cave fauna of southeast Asia. Origin, evolution and ecology. In: Wilkens, H., Culver, D. C. & Humphreys, W. F. (Eds.) *Subterranean ecosystems*. Elsevier, 603–32.
- Diesing, C. M. (1850). *Systema Helminthum*, Vol. 1, Vindobonae, apud W. Braumüller, 679 pp.
- Dobosy, P., Sávolgy, Z., Óvári, M., Mádl-Szőnyi, J., & Záray, G. (2016). Microchemical Characterization Of Biogeochemical Samples Collected From The Buda Thermal Karst System, Hungary. *Microchemical Journal*, 124, 116–20.
- Dobreanu, E. & Manolache, C. (1933). Beitrag zur Kenntnis der Amphipodenfauna Rumäniens. *Notationes Biologicae, Bucarest*, 1(3), 103–8.

- Dobreanu, E. & Manolache, C. (1936). Zur Kenntnis der Amphipodenfauna Rumäniens (Zweiter Beitrag). *Bulletin de la Section Scientifique, Académie Roumaine*, 18, 24–30.
- Dózsa-Farkas, K. (1970). The description of three new species and some data to the Enchytraeid fauna of the Baradla Cave, Hungary. *Opuscula Zoologica (Budapest)*, 10, 241–51.
- Dózsa-Farkas, K. (1974). A new *Fridericia* species (Oligochaeta, Enchytraeidae). *Annales Universitatis Scientiarum Budapestiensis de Rolando Eötvös Nominatae: Sectio Biologica*, 20, 27–32.
- Dózsa-Farkas, K. (1990). Zur Höhlen-Enchytraeiden-fauna Ungarns (Oligochaeta). *Mémoires de Biospéologie*, 17, 157–61.
- Drummond, A. J. & Rambaut, A. (2007). BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology*, 7, 214.
- Dudich, E. (1922). *Anophthalmus (Duvalites) hungaricus* Csiki in Gefangenschaft. *Entomologische Blätter*, 18, 177.
- Dudich, E. (1923). Die larve von *Anophthalmus (Duvalites) hungaricus* Csiki. *Annales Historico-Naturales Musei Nationalis Hungarici*, 20, 162–5.
- Dudich, E. (1924). Eine für Ungarn neue Amphipoden-Art. *Annales Historico-Naturales Musei Nationalis Hungarici*, 21, 244.
- Dudich, E. (1925a). Faunistikai jegyzetek I. *Állattani Közlemények*, 22, 39–46.
- Dudich, E. (1925b). A magyarországi denevérlegyek. *Mathematikai és Természettudományi Értesítő*, 41, 144–51.
- Dudich, E. (1925c). Az Abaligeti barlang vak rákjáról. *Állattani Közlemények*, 22(1–2), 46–51.
- Dudich, E. (1926). Faunistikai jegyzetek II. *Állattani Közlemények*, 23, 87–96.
- Dudich, E. (1927). Új rákfajok Magyarország faunájában. Neue Krebstiere in der Fauna Ungarns. *Archivum Balatonicum*, 1(3), 343–87.
- Dudich, E. (1928). Faunistikai jegyzetek. III. *Állattani Közlemények*, 24, 38–45.
- Dudich, E. (1930). Az Aggteleki barlang állatvilágának élelemforássai. *Állattani Közlemények*, 27, 67–85.
- Dudich, E. (1932). Biologie der Aggteleker Tropfsteinhöhle "Baradla" in Ungarn. *Spaläologischen. Monographien.*, 13, 246 pp.

- Dudich, E. (1940). Ein neuer *Niphargus* aus Ungarn. *Fragmenta Faunistica Hungarica* 3, Supplement: 16. oldal. *Niphargus Baloghi* sp. n.
- Dudich, E. (1941a). *Niphargus mediodanubialis* sp. nov., die am weitesten verbreitete *Niphargus*-Art des mittleren Donaubecken. *Fragmenta Faunistica Hungarica*, 4, 61–73.
- Dudich, E. (1941b). Die im Gebiete des historischen Ungarn nachgewiesenen Amphipoden. *Fragmenta Faunistica Hungarica*, 4 (1–4), 14–20.
- Dudich, E. (1941c). *Niphargus* aus einer Therme von Budapest. *Annales Historico-Naturales Musei Nationalis Hungarici*, 34 (Zool.), 165–76.
- Dudich, E. (1943). Neue *Niphargus*-Arten aus Siebenbürgischen Grundwässern. *Annales Historico-Naturales Musei Nationalis Hungarici*, 36, 47–66.
- Dudich, E. (1959). A Barlangbiológia és problémái. (Biospeologica Hungarica VI). A Magyar Tudományos Akadémia Biológia Csoportjának Közleményei, 3(3–4), 323–57.
- Dudich, E. (1960). Das höhlenbiologische Laboratorium der Eötvös Lorand Universität. Biospeologica Hungarica X. *Annales Universitatis Scientiarum Budapestiensis de Rolando Eötvös Nominatae: Sectio Biologica*, 3, 131–135.
- Dudich, E. (1967). Systematisches Verzeichnis der Tierwelt der Donau mit einer zusammenfassenden Erläuterung. In: Liepolt, R. (Ed.), *Limnologie der Donau* Stuttgart, 4–69.
- Dudich, E. (1964). Ein Biologisches Höhlenlaboratorium in Ungarn. *III Int. Kongress Speleologie, Wien*, 3, 61–3.
- Dudich, E. (1965). Höhlenbiologisches aus Ungarn. *Karszt és Barlang*, 4, 41–53.
- Eme, D., Zagmajster, M., Delić, T., Fišer, C., Flot, J.-F., Konecny-Dupré, L., Pálsson, S., Stoch, F., Zakšek, V., Douady, C. J. & Malard, F., (2018). Do cryptic species matter in macroecology? Sequencing European groundwater crustaceans yields smaller ranges but does not challenge biodiversity determinants. *Ecography*. 41(2), 424–36.
- Erőss, A. (2010). *Characterization of fluids and evaluation of their effects on karst development at the Rózsadomb and Gellért Hill, Buda Thermal Karst, Hungary*. PhD Dissertation, Eötvös Lóránd University, Budapest, 171 p.
- Esmaeili-Rineh, S., Sari, A., Delić, T., Moškrič, A. & Fišer, C. (2015). Molecular phylogeny of the subterranean genus *Niphargus* (Crustacea: Amphipoda) in the Middle East: a

- comparison with European *Niphargids*. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 175, 812–26.
- Falniowski, A., Prevorčnik, S., Delić, T., Alther, R., Altermatt, F. & Hofman, S. (2019). Monophyly of the Moitessieriidae Bourguignat, 1863 (Caenogastropoda: Truncatelloidea). *Folia Malacologica*, 27(1), 61–70.
- Farkas, H. (1957). Adatok az Abaligeti-barlang állatvilágának ismeretéhez. *Állattani Közlemények*, 46, 67–9.
- Fišer, C. (2012). *Niphargus*: a model system for evolution and ecology. In: Culver, D. C. & White, W.B. (Eds.), *Encyclopedia of Caves*. Academic Press, New York, pp. 555–64.
- Fišer, C. & Zagamajster, M. (2009). Cryptic species from cryptic space: The case of *Niphargus fongi* sp. n. (Amphipoda, Niphargidae). *Crustaceana*, 82, 593–614.
- Fišer, C., Sket, B. & Trontelj, P. (2008). A phylogenetic perspective on 160 years of troubled taxonomy of *Niphargus* (Crustacea: Amphipoda). *Zoologica Scripta*, 37, 665–80.
- Fišer, C., Trontelj, P., Luštrik, R. & Sket, B. (2009). Towards a unified taxonomy of *Niphargus* (Crustacea: Amphipoda): a review of morphological variability. *Zootaxa*, 2061, 1–22.
- Fišer, C., Coleman, C. O., Zagamajster, M., Zwitter, B., Gerecke, R. & Sket, B. (2010). Old museum samples and recent taxonomy: A taxonomic, biogeographic and conservation perspective of the *Niphargus tatrensis* species complex (Crustacea: Amphipoda). *Organisms Diversity and Evolution*, 10, 5–22.
- Fišer, Ž., Novak, L., Luštrik, R. & Fišer, C. (2016). Light triggers habitat choice of eyeless subterranean but not of eyed surface amphipods. *The Science of Nature*, 103, 7.
- Flot, J-F. (2010). SEQUENCEPHASE: a web tool for interconverting PHASE input/output files and FASTA sequence alignments. *Molecular Ecology Resources*, 10, 162–6.
- Flot, J-F., Wörheide, G. & Dattagupta, S. (2010). Unsuspected diversity of *Niphargus* amphipods in the chemoautotrophic cave ecosystem of Frasassi, central Italy. *BMC Evolutionary Biology*, 10, 171.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. & Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3, 294–9.

- Ford, D. C. (1995). Some thoughts on hydrothermal caves. *Cave Karst Sciences*. 22(3), 107–18.
- Forró, L. (1990). Aquatic crustaceans in the “Bátorligeti láp” Nature Reserve in NE Hungary. In: Mahunka, S. (Ed.), *The Bátorliget Nature Reserves – after forty years*. Studia Naturalia, Budapest, pp. 245–50.
- Franz, R., Bauer, J. & Morris, T. (1994). Review of biologically significant caves and their faunas in Florida and South Georgia. *Brimleyana* 20, 1–109.
- Frivaldszky, J. (1865). Adatok a magyarhoni barlangok faunájához. *Mathematikai és Természettudományi Közlemények*, 3, 17–53.
- Gebhardt, A. (1931). Az Abaligeti-barlang életvilága. *A Természet*, 15–16, 1–7.
- Gebhardt, A. (1933). Vergleichung der Tierwelt der Abaligeter – und Manfaer Höhlen. *Állattani Közlemények*, 30(1–2), 36–44.
- Gebhardt, A. (1934). Az Abaligeti-barlang élővilága. *Mathematikai és Természettudományi Közlemények*, 37(4), 1–264.
- Gebhardt, A. (1937). Die Tierwelt der Mänfaer Höhle. *Festschrift Prof. Dr. E. Strand*, 3, 217–40.
- Gebhardt, A. (1963). A Mecsek hegység barlangjainak biológiai vizsgálata. *Janus Pannonius Múzeum Évkönyve*, 8, 5–32.
- Gebhardt, A. (1967). A Mecsek hegység állatvilágának térbeli elterjedése élőhelyek szerint. *Janus Pannonius Múzeum Évkönyve*, 12, 7–14.
- Gere, G. (1964). Untersuchungen über die Tempereturtoleranz von *Mesoniscus graniger* J. Friv. (Crustacea, Isopoda) (Biospeleologica hungarica XIX.) . *Annales Universitatis Scientiarum Budapestiensis de Rolando Eötvös Nominatae: Sectio Biologica*, 7, 95–103.
- Gere, G. (1970). Untersuchungen über die Temperaturtoleranz von Höhlenlaufkäfern und Asseln (Biospeleologica hungarica XXXIII.). *Opuscula Zoologica (Budapest)*, 10(1), 105–13.
- Gerber, A. S., Templeton, A. R. (1996). Population Sizes and Within-Deme Movement of *Trimerotropis saxatilis* (Acrididae), a Grasshopper with a Fragmented Distribution. *Oecologia*, 105, 343–50.
- Geyer, F. & Mann H. (1940). Studien an Höhle und Thermalteich von Tapolca am Plattensee in Ungarn. *Archiv für Hydrobiologie*, 36, 359–85.

- Gidó, Zs. (2005). Carpathian elements of the benthic microcrustacean (Crustacea: Harpacticoida, Ostracoda) fauna of Hungary. *Acta Zool. Univ. Comenianae*, 47(1), 9–19.
- Gruber, P. & Gaál L. (Eds.) (2014). *A Baradla-Domica-barlangrendszer. A Barlang, mely összeköt.* Aggteleki Nemzeti Park Igazgatóság, Jósvalő, 512 pp.
- Gomez-Zurita, J., Petitpierre, E. & Juan, C. (2000). Nested cladistic analysis, phylogeography and speciation in the *Timarcha goettingensis* complex (Coleoptera, chrysomelidae). *Molecular Ecology*, 9, 557–70.
- Gvozdetzki, N. A., Morozav, A. I., Smirnov, S. A., & Golovatch, S. I. (1994). CEI, Bielorussie, Ukraine. _/ In: Juverthie, C. & Decu, V. (Eds), *Encyclopaedia Biospeologica*, tome I. Soc. Int. Biospéologie, Moulis, France, pp. 641– 648.
- Grabherr, M. G., Haas, B. J., Yassour, M., Levin, J. Z., Thompson, D. A., Amit, I., Adiconis, X., Fan, L., Raychowdhury, R., Zeng, Q., Chen, Z., Mauceli, E., Hacohen, N., Gnirke, A., Rhind, N., di Palma, F., Birren, B. W., Nusbaum, C., Lindblad-Toh, K., Friedman, N. & Regev, A. (2011). Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nature Biotechnology*, 29, 644–52.
- Gruner, H. E. (1965). Krebstiere oder Crustacea. Isopoda. In: Dahl. F. (Ed.) *Die Tierwelt Deutschlands und der angrenzenden Meeresteile*. 1–148. Gustav Fischer Press, Jena, Germany.
- Haas, B. J., Papanicolaou, A., Yassour, M., Grabherr, M., Blood, P. D., Bowden, J., Couger, M. B., Eccles, D., Li, B., Lieber, M., MacManes, M. D., Ott, M., Orvis, J., Pochet, N., Strozzi, F., Weeks, N., Westerman, R., William, T., Dewey, C. N., Henschel, R., LeDuc, R. D., Friedman, N. & Regev, A. (2013). De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nature Protocols*, 8, 1494–512.
- Hankó, B. (1924). Eine neue Amphipoden-Art aus Ungarn. *Annales Historico-Naturales Musei Nationalis Hungarici*, 21, 61–6.
- Heath. T., Hedtke, S. & Hillis, D. (2008). Taxon sampling and the accuracy of phylogenetic analyses. *Journal of Systematics and Evolution*, 46, 239–57.
- Hewitt, G. M. (2004). The structure of biodiversity – insights from molecular phylogeography. *Frontiers in Zoology*, 1, 4.

- Hill, C. R. (1974). *The sources and influence of the Descrittione di tutta Italia of Fra Leandro Alberti*. Ph.D. dissertation, University of Edinburgh.
- Hevesi, A. (1989). Development and evolution of karst regions in Hungary. *Karszt és Barlang, special issue*, 3–16.
- Ho, S. Y. W. & Shapiro, B. (2011). Skyline-plot methods for estimating demographic history from nucleotide sequences. *Molecular Ecology Resources*, 11, 423–34.
- Holsinger, J. R. & Culver, D. C. (1988). The invertebrate cave fauna of Virginia and a part of Eastern Tennessee: Zoogeography and ecology. *Brimleyana* 14, 1–162.
- Hofman, S., Rysiewska, A., Osikowski, A., Grego, J., Sket, B., Prevorčnik, S., Zagmajster, M. & Falniowski, A. (2018). Phylogenetic relationships of the Balkan Moitessieriidae (Caenogastropoda: Truncatelloidea). *Zootaxa*, 4486(3), 311–39.
- Hou, Z., Sket, B., Fišer, C. & Shuqiang, L. (2011). Eocene habitat shift from saline to freshwater promoted Tethyan amphipod diversification. *PNAS*, 108(35), 14533–38
- Hornok, S., Kontshán, J., Kováts, D., Kovács, R., Angyal, D., Görföl, T., Polacsek, Z., Kalamár, Z. & D. Mihalca (2014). Bat ticks revisited: *Ixodes adrianae* sp. nov. and allopatric genotypes of *I. vespertilionis* in caves of Hungary. *Parasites and Vectors*, 7(202), 1–9.
- Howarth, F. G. (1980). The zoogeography of specialized cave animals: a bioclimatic model. *Evolution*, 34, 394–406.
- Howarth, F. G. (1983). Ecology of cave arthropods. *Annual Review of Entomology*, 28, 365–89.
- Howarth, F. G. (1987). The evolution of non-relictual tropical troglobites. *International Journal of Speleology*, 16, 1–16.
- Hudec, I. & Mock, A. (2014). *Niphargus plurispinosus* sp. n. (Crustacea, Amphipoda), a stygophile and hypotelminorheic representative from Central Europe. *Subterranean Biology*, 13, 65–87.
- Humbert, A. (1876). Le *Niphargus puteanus* var. *Forelii*. *Bulletin de la Societe Vaudoise des Sciences Naturelles*, 14(2), 278– 398.
- Hurvich, C. M. & Tsai, C-L. (1989). Regression and time series model selection in small samples. *Biometrika*, 76, 297–307.

- Jaworowsky, A. (1893). Fauna studzienna Miast Krakowa i Lwowa. *Akademija Umiejetnosci, Krakow, Kimisya Fizyograficana, Sprawozdanie Komisji Fizyjograficknej*, 29–48.
- Jeffery, W. R. (2001). Cavefish as a model system in evolutionary developmental biology. *Developmental Biology*, 231, 1–12.
- Jeffery, W. R. (2005a). Adaptive Evolution of eye degeneration in the Mexican blind cavefish. *Journal of Heredity*, 96(2), 1–12.
- Jeffery, W. R. (2005b). Evolution of eye degradation in cavefish: the returne of pleiotropy. *Subterranean Biology*, 3, 1–11.
- Jeffery, W. R. & Martasian, D. P. (1998). Evolution of eye regression in the cavefish *Astyanax*. Apoptosis and the Pax6 gene. *American Zoologist*, 38, 685–96.
- Johnson, J. B. & Jordan, S. (2000). Phylogenetic divergence in leatherside chub (*Gila copei*) inferred from mitochondrial cytochrome b sequences. *Molecular Ecology*, 9, 1029–35.
- Juberthie, C. (2000). The diversity of the karstic and pseudokarstic hypogean habitats in the world. in: H. Wilkens, D. C. Culver & W. F. Humphries (Eds.) *Subterranean Ecosystems*. Amsterdam, Elsevier. pp. 17–39
- Juberthie, C., Bouillon, M. & Delay, B. (1981). Sur l'existence du milieu souterrainsuperficiel en zone calcaire. *Mémoires de Biospéologie*, 8, 77–93.
- Jurado-Rivera, J. A., Álvarez, G., Caro, J. A., Juan, C., Joan Pons, J. & Jaume, D. (2017). Molecular systematics of *Haploginglymus*, a genus of subterranean amphipods endemic to the Iberian Peninsula (Amphipoda: Niphargidae). *Contributions to Zoology*, 86(3), 239–60.
- Kane, T. C., Culver, D. C. & Jones, R. T. (1992). Genetic structure of morphologically differentiated populations of the amphipod *Gammarus minus*. *Evolution*, 46, 272–8.
- Kano, Y. & Kase, T. (2004). Genetic exchange between anchialine cave populations by means of larval dispersal: the case of a new gastropod species *Neritilia cavernicola*. *Zoologica Scripta*, 33, 423–37.
- Karaman, S. (1932). 5. Beitrag zur Kenntnis der Süßwasser-Amphipoden (Amphipoden unterirdischer Gewässer). *Prirodoslovne razprave, Ljubljana*, 2, 179–232.

- Karaman, S. (1943). Die Unterirdischen Amphipoden Südserbiens. *Ohridski Zbornik. Srpska Kraljevska Akademija. Posebna izdanja: prirodnjački i matematički spisi, knjiga* 85(34), 163–212.
- Karaman, S. (1950). *Niphargus smederevanus* N. sp. aus Nordserbien. *Srpska Akademija Nauka* 2, 1–9.
- Karaman, G. S. (1972). Catalogus Faunae Jugoslaviae, Crustacea Amphipoda (Contribution to the Knowledge of the Amphipoda 60). – *Consilium Academicarum Scientiarum Rei Publicae Socialisticae Foederativae Jugoslaviae, Academia Scientiarum et Artium Slovenica, Ljubljana*, 3 (3), 1–44.
- Karaman, G. S. (1976). Four new *Niphargus* species from Italy, *N. duplus*, *N. stygocharis italicus*, *N. ruffoi* and *N. canui* (Gammaridae). *Vie Milieu*, 26(1)C, 21–50.
- Karaman, G. S. (1986). One new species of family Niphargidae (Gammaridea), *Niphargus forroi* sp. n., from Hungary. *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 32,(1–2), 61–72.
- Katoh, K., & Standley, D. M. (2013). MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. *Molecular Biology and Evolution*, 30, 772–80.
- Katti, C., Kempler, K., Porter, M. L., Legg, A., Gonzalez, R., Garcia-Rivera, E., Dugger, D. & Battelle, B-A. (2010). Opsin co-expression in *Limulus* photoreceptors: differential regulation by light and a circadian clock. *Journal of Experimental Biology*, 213, 2589–601.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Meintjes, P. & Drummond, A. (2012). Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28, 1647–9.
- Kele, S. (2009). *Édesvízi mészkövek vizsgálata a Kárpát-medencéből: paleoklimatológiai és szedimentológiai elemzések*. Doktori disszertáció, ELTE-TTK és MTA Geokémiai Kutatóintézet, Budapest, 176 pp.
- Kele, S., Scheuer, Gy., Demény, A., Shen, C. C. & Chiang, H. W. (2009). U-series dating and isotope geochemical study of the Gellért Hill (Budapest) travertine. *Central European Geology* 52(3–4), 199–224.

- Kele, S., Scheuer, Gy., Demény, A., Shen, C. C., & Chiang, H. W. (2011). A Rózsadomb (Budapest) édesvízi mészköveinek U/Th sorozatos kormeghatározása és stabilizotóp-geokémiai vizsgálata. *Földtani Közlöny* 141(3), 293–312.
- Kelley, J. L. & Davies, W. I. L. (2016). The biological mechanisms and behavioral functions of opsin-based light detection by the skin. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 4, 106.
- Kender, J. (1939). A Szent Lukács-fürdő tavának limno-biológiai vizsgálata. *Palaestra Calasanctiana*, 25, 24 pp.
- Kenk, R. (1974). Index of the Genera and Species of the Freshwater Triclad (Turbellaria) of the World. *Smithsonian Contributions to Zoology*, 183, 1–90.
- Kesselyák, A. (1936). Bars vármegye szárazföldi ászkarákjai (Die Landasselfauna von Komitat Bars). *Állattani Közlemények*, 33, 142–8.
- Ketmaier, V., Argano, R. & Caccone, A. (2003). Phylogeography and molecular rates of subterranean aquatic Stenasellid Isopods with a peri-Tyrrhenian distribution. *Molecular Ecology*, 12, 547–55.
- Klie, W. (1930). Eine neue unterirdisch lebende Art der Ostracodengattung Candona. *Állattani Közlemények*, 27, 163–7.
- Klimchouk, A. (2004a). Asia, central. In: Gunn, J. (Ed.) *Encyclopedia of caves and karst science*. Fitzroy-Dearborn, New York, pp. 94–96.
- Klimchouk, A. (2004b). Caucasus, Georgia. In: Gunn, J. (Ed.) *Encyclopedia of caves and karst science*. Fitzroy-Dearborn, New York, pp. 200–3.
- Klimchouk, A. (2007). Hypogene Speleogenesis: Hydrogeological and Morphogenetic Perspective. *Special Paper No.1, National Cave and Karst Research Institute, Carlsbad, NM*, 106 pp.
- Koch, C. L. (1836). Deutschlands Crustaceen Myriapoden und Arachniden. In: Panzer, G. W. F. (Ed.) *Herrich-Schaeffer's Deutschlands Insecten*, vol. 5, Regensburg.
- Konec, M., Prevorčnik, S., Sarbu, S. M., Verovnik, R. & Trontelj P. (2015). Parallels between two geographically and ecologically disparate cave invasions by the same species, *Asellus aquaticus* (Isopoda, Crustacea). *Journal of Evolutionary Biology*, 28, 864–875.
- Kontschán, J. (2002). A Dunántúli-középhegység (Gerecse, Vértes és Bakony-vidék) Peracarida faunája. I. vízi fajok (Amphipoda et Isopoda: Asellota). *Folia Historico-Naturalis Bakonyensis Zirc*, 19, 24–30.

- Kontschán, J., Muskó, I. & Murányi, D. (2002). A felszíni vizekben előforduló felemáslábú rákok (Crustacea: Amphipoda) rövid határozója és előfordulásuk Magyarországon. *Folia Historico-naturalia Musei Matraensis*, 25, 151–7.
- Kontschán, J. (2004). The aquatic Amphipoda and Isopoda (Crustacea) of the Transdanubian Mountains in Northwest Hungary. *Lauterbornia*, 49, 73–6.
- Kontschán, J., Hegyessy, G. & Csordás, B. (2006) Abaúj és Zemplén tájainak makroszkopikus rákjai (Crustacea). *Információk Északkelet-Magyarország természeti értékeiről: 5. Abaúj-Zemplén Értékeiért Közhasznú Egyesület, Sátoraljaújhely, 2006.*
- Košel, V. (1975). O pôvode pijavic konských (Hirudinea) v jaskynnom systéme Domica. *Slovenský Kras*, 13, 191–3.
- Kosswig, C. (1965). Génétique et évolution regressive. *des Questions Scientifiques*, 136, 227–257.
- Kordos, L., Jakucs, L. & Gádoros M. (1984). *Magyarország barlangjai*. Gondolat Kiadó, Budapest, 326 pp.
- Korsós, Z. (2000). Rare and endemic millipedes (Diplopoda) of the Abaliget Cave. In: A. Mock, L. Kováč & M. Fulín (Eds.) *Fauna jaskýň – Cave Fauna*. Vsl. múzeum, Košice, pp. 61–66.
- Kováč, L., Elhottová, D., Mock, A., Nováková, A., Krištůfek, V., Chroňáková, A., Lukešová, A., Mulec, J., Košel, V., Papáč, V., Ľuptáčík, P., Uhrin, M., Višňovská, Z., Hudec, I., Gaál, L., Bella, P., (2014). *The cave biota of Slovakia*. State Nature Conservancy SR, Slovak Caves Administration, Liptovský Mikuláš, 192 pp.
- Kovács, I. E. (1953). Biológiai terepszemle az aggteleki Békebarlangban. In: L. Jakucs (Ed.). *A Békebarlang felfedezése*. Művelt Nép Könyvkiadó, Budapest, pp. 86–91.
- Kovács, I. E. (1954). Első vizsgálatok az aggteleki Béke-barlang faunáján. *Állattani Közlemények*, 44(1–2), 95–8.
- Kovács J. & Müller P. (1980). A Budai-hegyek hévizes tevékenységének kialakulása és nyomai. *Karszt és Barlang*, 2, 93–8.
- Kumar, S., Stecher, G. & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33, 1870–4.

- Lanfear, R., Calcott, B., Ho, S. Y. W. & Guindon, S. (2012). PartitionFinder: Combined Selection of Partitioning Schemes and Substitution Models for Phylogenetic Analyses. *Molecular Biology and Evolution*, 29, 1695–701.
- Lanfear, R., Frandsen, P. B., Wright, A. M., Senfeld, T., & Calcott, B. (2016). PartitionFinder 2 : New Methods for Selecting Partitioned Models of Evolution for Molecular and Morphological Phylogenetic Analyses, *Molecular Biology and Evolution*, 34, 772–3.
- Langecker, T. G., Schmale, H. & Wilkens, H. (1993). Transcription of the opsin gene in degenerate eyes of cave-dwelling *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae) and of its conspecific epigeal ancestor during early ontogeny. *Cell and Tissue Research*, 273, 183–92.
- Langille, B. L., Tierney, S. M., Austin, A. D., Humphreys, W. F. & Cooper, S. J. B. (2018). How blind are they? Phototactic responses in stygobiont diving beetles (Coleoptera: Dytiscidae) from calcrete aquifers of Western Australia: negative phototaxis in subterranean diving beetles. *Austral Entomology*, 58, 425–31.
- Lantos, G. (1986). Data to the Amphipoda and Isopoda fauna of Tóserdő and its environs in the Tisza valley. I. Amphipoda, Asellota (Crustacea, Peracarida). *Tiscia*, 21, 81–4.
- Laurenti, J. N. (1768). *Specimen medicum, exhibens synopsin reptilium emendatam cum experimentis circa venena et antidota reptilium Austriacorum*. Wien: Joan Thomae.
- Leél-Össy, Sz., Bergmann, Cs. & Bognár, Cs. (2011). A budapesti Molnár János-barlang termálvizének veszélyeztetettsége. *A Miskolci Egyetem Közleménye, A sorozat, Bányászat*, 81, 91-102
- Leél-Össy, Sz. (2017). Caves of the Buda Thermal Karst. in: Klimchouk, A., Palmer, N. A., De Waele, J., Auler, S. A., Audra, P. (Eds.) *Hypogene Karst Regions and Caves of the World*. Cave and Karst Systems of the World. Springer, Cham, pp. 279–97.
- Leigh, J. W. & Bryant, D. (2015). POPART : full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution*, 6, 1110–6.
- Lefébure, T., Douady, C. J., Gouy, M., Trontelj, P., Briolay, J. & Gibert, J. (2006). Phylogeography of a subterranean amphipod reveals cryptic diversity and dynamic evolution in extreme environments. *Molecular Ecology*, 15, 1797–806.

- Lefébure, T., Douady, C. J., Malard, F. & Gibert, J. (2007). Testing dispersal and cryptic diversity in a widely distributed groundwater amphipod (*Niphargus rhenorhodanensis*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 42, 676–86.
- Lénárt, L. (1981). Contribution to the research of the travertine caves of Lillafüred. *Karszt és Barlang*, 1–2, 1–7.
- Leys, R., Watts, C. H. S., Cooper, S. J. B. & Humphreys, W. F. (2003). Evolution of subterranean diving beetles (Coleoptera: Dytiscidae: Hydroporini, Bidessini) in the arid zone of Australia. *Evolution* 57, 2819–34.
- Li, H. & Cooper, R. L. (2001). Spatial familiarity in the blind cave crayfish, *Orconectes australis packardii*. *Crustaceana*, 74, 417–33.
- Li, H. & Cooper, R. L. (2002). The effect of ambient light on blind cave crayfish: social interactions. *Journal of Crustacean Biology*, 22, 449–58.
- Loksa, I. (1959a). Das Vorkommen ein neuen Höhlencollembola (*Folsomia antricola* n. sp.) und von *Folsomia multiseta* Stach in Ungarn. *Opuscula Zoologica (Budapest)*, 3(1), 37–42.
- Loksa, I. (1959b). Ein *Brachydesmus* (Diplopoda) fossil aus der Glazialzeit ungarns. *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 4(3–4), 369–74.
- Loksa, I. (1959c). Ökologische und faunistische Untersuchungen in der Násznép-Höhle des Naszály-Berges. (Biospeleologica Hungarica, VI.) *Opuscula Zoologica (Budapest)*, 3(2), 63–80.
- Loksa, I. (1960a). Faunistisch-systematische und ökologische Untersuchungen in der Lóczy-Höhle bei Balatonfüred. (Biospeleologica Hungarica, XI). *Opuscula Zoologica (Budapest)*, 6, 253–66.
- Loksa, I. (1960b). Über die Landarthropoden der Teichhöhle von Tapolca (Ungarn). *Opuscula Zoologica (Budapest)*, 4, 39–51.
- Loksa, I. (1961a). Ökologisch-Faunistische Untersuchungen in der Freiheits-Höhle bei Égerszög. *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 7(1–2), 219–31.
- Loksa, I. (1961b). A Kovácsi-hegy ízeltlábúiról. *Állattani Közlemények*, 48, 65–80.
- Loksa, I. (1962a). Beiträge zur Kenntnis der Weberknecht-Fauna Ungarns, I. *Zoologischer Anzeiger*, 168, 265–269.
- Loksa, I. (1962b). Über die Landarthropoden der István-, Forrás- und Szeleta-Höhle bei Lillafüred. (Biospeleologica Hungarica, XV.). *Karszt és Barlang*, 3, 59–81.

- Loksa, I. (1967). Vier neue Höhlencollembohlen aus Ungarn. *Opuscula Zoologica (Budapest)*, 6(2), 289–96.
- Loksa, I. (1969). Zwei neue Arrhopalites Unterarten (Collembola) aus Höhlen in Ungarn. *Opuscula Zoologica (Budapest)*, 9(2), 357–61.
- Loksa, I. (1970). Die Spinnen der "Kölyuk"-Höhlen in Bükkgebirge. *Annales Universitatis Scientiarum Budapestiensis de Rolando Eötvös Nominatae: Sectio Biologica*, 12, 269–76.
- Magniez, G. (2000). Redescription de *Protelsonia hungarica* (Crustacea, Isopoda, Asellota, Stenasellidae) et validité du genre *Protelsonia*. *Mémoires de Biospéologie*, 27, 83–87.
- Mahunka, S. (Ed.) (1993). The Fauna of the Bükk National Park, I. Hungarian Natural History Museum, 456 pp.
- Mahunka, S. (Ed.) (1996a). The Fauna of the Bükk National Park, II. Hungarian Natural History Museum, 655 pp.
- Mahunka, S. (Ed.) (1999a). The Fauna of the Aggtelek National Park, I. Hungarian Natural History Museum, 372 pp.
- Mahunka, S. (Ed.) (1999b). The Fauna of the Aggtelek National Park, II. Hungarian Natural History Museum, 404 pp.
- Marcus, J. H., Sutcliffe, D. W. & Willoughby, L. G. (1978). Feeding and growth of *Asellus aquaticus* (Isopoda) on food items from the littoral of Windermere, including green leaves of *Elodea canadensis*. *Freshwater Biology*, 8(6), 505–19.
- Manthey, J. D. & Moyle, R. G. (2015). Isolation by environment in White-breasted Nuthatches (*Sitta carolinensis*) of the Madrean Archipelago sky islands: a landscape genomics approach. *Molecular Ecology*, 24, 3628–38.
- Mathieu, J., Jeannerod, F., Hervant, F. & Kane, T. C. (1997). Genetic differentiation of *Niphargus rhenorhodanensis* (Amphipoda) from interstitial and karst environments. *Aquatic Sciences*, 59, 39–47.
- McInerney, C. E., Maurice, L., Robertson, A. L., Knight, L. R. F. D., Arnscheidt, J., Venditti, C., Dooley, J. S. G., Mathers, T., Matthijs, S., Eriksson, K., Proudlove, G. S. & Hänfling, B. (2014). The ancient Britons: groundwater fauna survived extreme climate change over tens of millions of years across NW Europe. *Molecular Ecology*, 23, 1153–66.

- Megyeri, J. (1953). Bátorliget rák-faunája. In: Székessy, V. (Ed.) *Bátorliget élővilága*. Akadémiai Kiadó, Budapest, pp. 146–54.
- Méhelý, L. (1900). *Monographia Chiropterorum Hungariae*. Magyar Nemzeti Múzeum, Budapest, 372 pp.
- Méhelý, L. (1924). *Protelsonia hungarica*, nov. gen. Einer blinder Isopode aus Ungarn. *Zoologischer Anzeiger*, 58, 353–7.
- Méhelý, L. (1925). A magyar középhegység, jelesen a Bükk, a Bakony és a Mecsek planáriái. *Mathematikai és Természettudományi Értesítő*, 41, 178–184.
- Méhelý, L. (1927). *Új férgek és rákok a Magyar faunában. Neue Würmer und Krebse aus Ungarn*. Held nyomda, Budapest, 19 pp.
- Méhelý, L. (1937). *Niphargus hungaricus*, ein neuer Amphipode aus Ungarn. *Zoologischer Anzeiger*, 120, 117–9.
- Méhelý, L. (1941). *A Niphargus kutatás új útjai. Neue Wege der Niphargus-Forschung*. Budapest, 36. pp.
- Mejía-Ortíz, L. M. & Hartnoll, R. (2006). A new use for useless eyes in cave crustaceans. *Crustaceana*, 79, 593–600.
- Mejía-Ortíz, L. M. & López-Mejía, M. (2005). Are there adaptation levels to cave life in crayfish? *Journal of Crustacean Biology*, 25, 593–97.
- Meisch, C. (2000). *Freshwater Ostracoda of Western and Central Europe*. Spektrum Akademischer Verlag, Volume 8, 522 pp.
- Meleg, I.N., Zakšek, V., Fišer, C., Kelemen, B. S. & Moldovan, O. T. (2013). Can environment predict cryptic diversity? The case of *Niphargus* inhabiting western Carpathian groundwater. *PLoS ONE*, 8, e76760.
- Mlejnek, R. & Ducháč V. (2003). Troglobiontní a endogenní výskyt druhu *Mesoniscus graniger* (Crustacea: Isopoda: Oniscoidea) na území Západních Karpat. *Acta Musei. Reginaehradecensis, serie A*, 29, 71–9.
- Miller, M. A., Pfeiffer, W., & Schwartz, T. (2010). "Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees" in *Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE)*, 14 Nov. 2010 (pp. 1–8) New Orleans, USA.
- Minh, B. Q., Nguyen, M. A. T., & von Haeseler, A. (2013). Ultrafast Approximation for Phylogenetic Bootstrap. *Molecular Biology and Evolution*, 30, 1188–95.

- Miraldo, A., Hewitt, G. M., Dear, P. H., Paulo, O. S. & Emerson, B. C. (2012). Numts help to reconstruct the demographic history of the ocellated lizard (*Lacerta lepida*) in a secondary contact zone. *Molecular Ecology*, 21, 1005–18.
- Mulliss, R. M., Revitt, D. M. & Shutes, R. B. E. (1994). An evaluation of the toxic influences on *Asellus aquaticus* (L.) in an urban stream environment. *Water ScienceTechnology*, 29, 199–207.
- Muskó, I. (1994). Occurrence of Amphipoda in Hungary since 1853. *Crustaceana* 66(2), 144–52.
- Muskó, I. (2007). Checklist of Hungarian Malacostraca. Available from: http://ttk.pte.hu/biologia/hidrobiologia/mavige/dokument/hungarian_malacostraca_checklist.pdf (accessed 21 December 2018)
- Nabhan, A. R. & Sarkar, I. N. (2011). The impact of taxon sampling on phylogenetic inference: a review of two decades of controversy. *Briefings in Bioinformatics*, 13, 122–34.
- Namietko, T., Meisch, C., Gidó, ZS. & Danielopol D. L. (2001). Redescription, taxonomy, distribution and ecology of *Cryptocandona dudichi* (Klie, 1930) (Crustacea, Ostracoda). *Bulletin de la Société des naturalistes luxembourgeois*, 102, 109–30.
- Nei, M. & Gojobori T. (1986). Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Molecular Biology and Evolution*, 3, 418–26.
- Nesemann, H., Pöckl, M., & Wittmann, K. J. (1995). Distribution of epigean Malacostraca in the middle and upper Danube (Hungary, Austria, Germany). *Miscellanea Zoologica Hungarica*, 10, 49–68.
- Nguyen, L. T., Schmidt, H. A., von Haeseler, A., & Minh, B. Q. (2015). IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum likelihood phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 32, 268–74.
- Noodt, W. (1967). Syncarida. In: Illies, J. (Ed.): *Limnofauna Europaea*. VEB G. Fischer Verlag, Jena, pp. 187–8.
- Nosek, J. N. & Oertel, N. (1980). Zoologische Untersuchungen an Aufwüchsen in der Donau zwischen Rajka und Budapest. *Annales Universitatis Scientiarum Budapestinensis de Rolando Eötvös Nominatae Sectio Biologica*, 22–23, 187–204.

- Nosil, P., Egan, S. P. & Funk, D. J. (2008). Heterogeneous genomic differentiation between walking-stick ecotypes: “isolation by adaptation” and multiple roles for divergent selection. *Evolution*, 62, 316–36.
- Novák, J. & Kutasi Cs. (2014). New data on the Pseudoscorpion fauna of the caves of the Bakony Mountains, Hungary. *Opuscula Zoologica (Budapest)*, 45(2), 189–94.
- Orsini, L., Vanoverbeke, J., Swillen, I., Mergeay, J. & De Meester, L. (2013). Drivers of population genetic differentiation in the wild: isolation by dispersal limitation, isolation by adaptation and isolation by colonization. *Molecular Ecology*, 22, 5983–99.
- Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C. A., Motoshima, H., Fox, B. A., Trong, I. L., Teller, D. C., Okada, T., Stenkamp, R. E., Yamamoto, M. & Miyano, M. (2000). Crystal structure of rhodopsin: a G protein-coupled receptor. *Science*, 289, 739–45.
- Papp, L. & Woźnica A. (1993). A revision of the Palaearctic species of *Gymnomus* Loew. *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 39(1–4), 175–210.
- Peck, S. B. (1970). The terrestrial arthropod fauna of Florida caves. *The Florida Entomologist*, 53, 203–7.
- Peck, S.B. (1984). The distribution and evolution of cavernicolous Ptomaphagus beetles in the southeastern United States (Coleoptera; Leiodidae; Cholevinae) with new species and records. *Canadian Journal of Zoology*, 62, 730–40
- Peck, S. B. (1989). The cave fauna of Alabama: Part I. The terrestrial invertebrates (excluding insects). *NSS Bulletin* 51, 11–33.
- Peck, S.B., & Finston, T.L., (1993). Galapagos Islands troglobites: the questions of tropical troglobites, parapatric distributions with the eyed sister-species, and their origin by parapatric speciation: *Memoires de Biospeleologie*, 5(20), 19–37.
- Pei, J. & Grishin, N. V. (2014). PROMALS3D: multiple protein sequence alignment enhanced with evolutionary and threedimensional structural information. *Methods in Molecular Biology*, 1079, 263–71.
- Pérez-Moreno, J. L., Iliffe, T. M. & Bracken-Grissom, H. D. (2016). Life in the underworld: anchialine cave biology in the era of speleogenomics. *International Journal of Speleology*, 45, 149–70.

- Pérez-Moreno, J. L., Balázs, G., Wilkins, B., Herczeg, G. & Bracken-Grissom, H. D. (2017). The role of isolation on contrasting phylogeographic patterns in two cave crustaceans. *BMC Evolutionary Biology*, 17, 247.
- Pérez-Moreno, J. L., DeLeo, D., Palero, F. & Bracken-Grissom, H. D. (2018a). Phylogenetic annotation and genomic architecture of opsin genes in Crustacea. *Hydrobiologia*, 825(1), 159–75.
- Pérez-Moreno, J. L., Balázs, G. & Bracken-Grissom, H. D. (2018b). Transcriptomic and epigenetic insights into the evolution of vision loss in cave-dwelling crustaceans. *Integrative and Comparative Biology* 58(3), 452–64.
- Petkovic, M., DeliĆ. T., Lučić, L. & Fišer, C. (2015). Description of a new species of *Niphargus* (Crustacea: Amphipoda: Niphargidae): The first record of a lake ecomorph in the Carpathian Mountains. *Zootaxa*, 4027(1), 117–29.
- Petkovski, T. K. (1972). Zur Copepodenfauna der Höhlen von Banat. *Acta Musei Macedonici Scientiarum Naturalium*, 13(2), 21–38.
- Philippe, H., Derelle, R., Lopez, P., Pick, K., Borchellini, C., Boury-Esnault, N., Vacelet, J., Renard, E., Houliston, E., Quéinnec, E., Da Silva, C., Wincker, P., Le Guyader, H., Leys, S., Jackson, D. J., Schreiber, F., Erpenbeck, D., Morgenstern, B., Woörheide, G. & Manuel, M. (2009). Phylogenomics revives traditional views on deep animal relationships. *Current Biology*, 19, 706–12.
- Philippe, H., Brinkmann, H., Lavrov, D. V., Littlewood D. T. J., Manuel, M., Wörheide, G. & Baurain, D. (2011). Resolving difficult phylogenetic questions: why more sequences are not enough, *PLoS Biology*, 9, e1000602
- Phillips, M. J., Delsuc, F. & Penny, D. (2004). Genome-scale phylogeny and the detection of systematic biases. *Molecular Biology and Evolution*, 21, 1455–8.
- Pintér, L. (1968). Zur Kenntnis der Hydrobiiden das Mecsek-Gebirges (Ungarn) (Gastropoda: Prosobranchia). *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 14(3–4), 441–5.
- Polak, S., DeliĆ, T., Kostanjšek, R. & Trontelj, P. (2016). Molecular phylogeny of the cave beetle genus *Hadesia* (Coleoptera: Leiodidae: Cholevinae: Leptodirini), with a description of a new species from Montenegro. *Arthropod Systematics & Phylogeny*, 74(3), 241–54.

- Ponyi, E. (1956). Eine neue Elaphodiella-Art aus Ungarn. *Opuscula Zoologica (Budapest)*, 1(1–4), 41–6.
- Ponyi, E. (1957). Neue Bathynelliden aus Ungarn. *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 3, 171–7.
- Ponyi, E. (1958). Unterirdische Harpactoïden aus Ungarn. *Zoologischer Anzeiger*, 160, 73–7.
- Ponyi, J. (1962). Zoologische Untersuchung der Röhrichte des Balaton. I. Krebse (Crustacea). *Annales Instituti Biologici*, 29, 129–63.
- Poros, Zs., Erőss, A., Mádl-Szőny, J., Mindszenty, A., Molnár, F., Ronchi, P. & Csoma, A. E. (2010). Mixing of karstic and basinal fluids affecting hypogene cave formation and mineralization in the Buda Thermal Karszt, Hungary. In: *20th General Meeting of the International Mineralogical Association, IMA2010, 21-27 August 2010, Budapest, Hungary, Acta Mineralogica Petrographica Abstract Series 6*, 465.
- Porter, M. L. (2016). Beyond the eye: molecular evolution of extraocular photoreception. *Integrative and Comparative Biology*, 56, 842–52.
- Porter, M. L., Steck, M., Roncalli, V. & Lenz, P. H. (2017). Molecular characterization of copepod photoreception. *Biological Bulletin*, 233, 96–110.
- Prendini, L., Francke, O. F. & Vignoli, V. (2010). Troglomorphism, trichobothriotaxy and typhlochactid phylogeny (Scorpiones, Chactioidea): more evidence that troglobitism is not an evolutionary dead-end. *Cladistics*, 26, 117–42.
- Prevorčnik, S., Blejec, A. & Sket, B. (2004). Racial differentiation in *Asellus aquaticus* (L.) (Crustacea:Isopoda:Asellidae). *Archiv für Hydrobiologie*. 160, 193–214.
- Protas, M., Conrad, M., Gross, J. B., Tabin, C. & Borowsky, R. (2007). Regressive evolution in the Mexican cave tetra, *Astyanax mexicanus*. *Current Biology*, 17, 452–4.
- R Development Core Team. (2008). R: A Language and Environment for Statistical Computing [Internet]. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing;. Elérhetőség: <http://www.R-project.org>
- Racoviță E. G. (1907). Essai sur les problemes biospeologiques. *Archives de Zoologica Expérimentale et Générale (Biospeol I)*, 4(6), 371–488.
- Rambaut, A., Suchard, M. & Drummond, A. (2014). Tracer v1.6 [Internet].Elérhetőség: <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>

- Rambaut, A., Drummond, A. J., Xie, D., Baele, G., & Suchard, M. A. (2018). Posterior Summarization in Bayesian Phylogenetics Using Tracer 1.7. *Systematic Biology*, 67, 901–4.
- Revell, L. J. (2012). Phytools: an R package for phylogenetic comparative biology (and other things): phytools: R package. *Methods in Ecology and Evolution*, 3, 217–23.
- Richling, I., Makowsky, Y., Kuhn, J., Niederh offer, H. J., & Boeters, H. D. (2017). A vanishing hotspot – The impact of molecular insights on the diversity of Central European Bythiospeum Bourguignat, 1882 (Mollusca: Gastropoda: Truncatelloidea). *Organisms, Diversity and Evolution*, 17(1), 67–85.
- Romero, A. (1985). Cave colonization by fish: role of bat predation. *American Midland Naturalist*, 113, 7–12.
- Romero, A. (2009). *Cave Biology: Life in Darkness*. Cambridge University Press, Cambridge. 291 pp.
- Romero, A. & S. M. Green. (2005). The end of regressive evolution: examining and interpreting the evidence from cave fishes. *Journal of Fish Biology*, 67, 3–32.
- Ronquist, F. & Huelsenbeck, J. P. (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19, 1572–4.
- Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D. L., Darling, A., H hna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M. A., & Huelsenbeck, J. P. (2012). MrBayes 3 . 2 : Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice Across a Large Model Space. *Systematic Biology*, 61, 539–42.
- Rouch, R. & Danielopol, D. (1987). L’origine de la fauna aquatique souterraine, entre le paradigme du refuge et le modèle de la colonization active. *Stygologia*, 3, 345–72.
- Ruffo S. (1957). Le attuali conoscenze sulla fauna cavernicola della Regione Pugliese. *Memorie di Biogeografia Adriatica*, 3, 1–143.
- Salamon, G., D nyi, L., Angyal, D., Balázs, G. & Forr  L. (2014). A Baradla gerinctelen faunája. In: P. Gruber &  . Ga l (Eds): *A Baradla-Domica-barlangrendszer. A Barlang, mely  sszek t*. Aggteleki Nemzeti Park Igazgatóság, J svaf , pp. 279–306.
- Salcedo, E., Farrell, D. M., Zheng, L., Phistry, M., Bagg, E. E. & Britt, S. G. (2009). The green-absorbing Drosophila Rh6 visual pigment contains a blue-shifting amino acid substitution that is conserved in vertebrates. *Journal of Biological Chemistry*, 284, 5717–22.

- Sarbu, S. M., Kane, T. C. & Kinkle, B. K. (1996). A chemoautotrophic based cave ecosystem. *Science* 272, 1953–5.
- Sarbu, S. & Popa, V. (1993). An unique chemo-autotrophically based cave ecosystem. In: Camacho A. (Ed.). *The natural history of Biospeology*, Madrid, pp. 641–666.
- Schellenberg, A. (1933). Weitere deutsche und ausländische Niphargiden. *Zoologischer Anzeiger*, 102, 22–3.
- Schellenberg, A. (1934). Amphipoden aus Quellen, Seen und Höhlen. *Zoologischer Anzeiger*, 106, 200–9.
- Schellenberg, A. (1935). Schlüssel der Amphipodengattung *Niphargus* mit Fundortangaben und mehreren neuen Formen. *Zoologischer Anzeiger*, 111, 204–11.
- Schellenberg, A. (1937). Bemerkungen zu meinem *Niphargus*-Schlüssel und zur Verbreitung und Variabilität der Arten, nebst Beschreibung neuer *Niphargus*-Formen. *Mitteilungen aus dem Zoologischen Museum in Berlin*, 22, 1–30.
- Schellenberg, A. (1938a). Tschechoslowakische Amphipoden. *Zoologischer Anzeiger*, 121, 239–44.
- Schellenberg, A. (1938b). Alters-, Geschlechts- und Individualunterschiede des Amphipoden *Niphargus tatrensis* f. *aggtelekiensis* Dudich. *Zoologische Jahrbücher (Syst)*, 71, 191–202.
- Schellenberg, A. (1940). Subterrane Amphipoden Osteuropas, ihre Variabilität und ihre verwandschaftliche Beziehungen. *Zoologische Jahrbücher (Syst)*, 74, 243–68.
- Schiner, J. R. (1854). Fauna der Adelsberg, Lueger und Magdalener-grotte. in: Schmidle, A. (Ed.) *Die Grotten und Hölen von Adelsberg, Lueg, Planina und Lass*. Wien, Braunmüller, 316 pp.
- Schiödte, J. C. (1847). Undersogelser over den underjordiske Fauna i Hulerne i Krain og Istrien. *Oversigt over det Kongelige danske Videnskabernes Selskabs Forhandling og dets Medlemmers Arbejder i Aaret*, 4, 75–82.
- Schiödte, J. C. (1849). *Specimen Faunæ Subterraneae*. Bidrag til den Underjordiske Fauna. Kjöbenhavn: Bianco Luno.
- Schmidl, A. (1856). Die Baradla-Höhle bei Aggtelek und die Lednice-Eishöhle bei Szilítze im Gömörer Comitate Ungarns. *Sitzungsberichte der Kaiserlichen Akademie der Wissenschaften. Mathematisch-Naturwissenschaftliche Classe*, 22, 579–621.

- Simão, F. A., Waterhouse, R. M., Ioannidis, P., Kriventseva, E. V. & Zdobnov, E. M. (2015). BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. *Bioinformatics*, 31, 3210–2.
- Sket, B. (1985). Why all cave animals do not look alike—a discussion on adaptive value of reduction processes. *NSS Bulletin*, 47, 78–85.
- Sket, B. (1994). Distribution of *Asellus aquaticus* (Crustacea: Isopoda: Asellidae) and its hypogean populations at different geographic scales, with a note on *Proasellus istrianus*. *Hydrobiologia*, 287, 39–47.
- Sket, B. (1999). High biodiversity in hypogean waters and its endangerment—the situation in Slovenia, the Dinaric karst, and Europe. *Crustaceana*, 72, 767–779.
- Sket, B. (2008). Can we agree on an ecological classification of subterranean animals? *Journal of Natural History*, 42, 1549–63.
- Smith-Unna, R., Boursnell, C., Patro, R., Hibberd, J. M. & Kelly, S. (2016). TransRate: reference-free quality assessment of de novo transcriptome assemblies. *Genome Research*, 26, 1134–44.
- Som, A. (2014). Causes, consequences and solutions of phylogenetic incongruence. *Briefings in Bioinformatics*, 16, 536–48.
- Song, L. & Florea, L. (2015). Rcorrector: efficient and accurate error correction for Illumina RNA-seq reads. *GigaScience*, 4, 48.
- Soós, L. (1927). Adatok a Magyarország barlangok Mollusca-faunának ismeretéhez (Contribution to the knowledge of the Mollusca fauna of some Hungarian caves). *Állattani Közlemények*, 24, 163–80, 207–11.
- Speiser, D. I., Pankey, M., Zaharoff, A. K., Battelle, B. A., Bracken-Grissom, H. D., Breinholt, J. W., Bybee, S. M., Cronin, T. W., Garm, A., Lindgren, A. R., Patel, N. H., Porter, M. L., Protas, M. E., Rivera, A.S., Serb, J. M., Zigler, K. S., Crandall, K. A. & Oakley, T. H. (2014). Using phylogenetically-informed annotation (PIA) to search for light-interacting genes in transcriptomes from non-model organisms. *BMC Bioinformatics*, 15, 350.
- Stephens, M., Smith, N. J. & Donnelly, P. (2001). A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *The American Journal of Human Genetics*, 68, 978–89.

- Stephens, M. & Donnelly, P. (2003). A comparison of bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data. *The American Journal of Human Genetics*, 73, 1162–9.
- Stiller, J. (1953). Bátorliget limnológiai viszonyai. In: Székessy, V. (Ed.) *Bátorliget élővilága*. Akadémiai Kiadó, Budapest, pp. 75–100.
- Stloukal, E. (2004). First record of *Niphargus dudichi* (Crustacea: Amphipoda) in surface waters. *Biologia Bratislava*, 59/Suppl. 15, 49–50.
- Sukumaran, J. & Holder, M. T. (2010). DendroPy: a Python library for phylogenetic computing. *Bioinformatics*, 26, 1569–71.
- Szabó, Á., Ripka, G., Hajdú, Zs., Tempfli, B., Varga, M., Mészáros, I., Kutasi, CS., Németh, T. & Péntes B. (2013). New Data on the Mesostigmatid Mite Fauna of Hungary (Acari: Mesostigmata). *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*, 48(1), 149–54.
- Szanyi, G., Surányi, G. & Leél-Össy, Sz. (2012). Cave development and Quaternary uplift history in the Central Pannonian Basin derived from speleothem ages. *Quaternary Geochronology* 14, 18–25.
- Szedzerjesi, T., Angyal, D., Balázs, G. & Dányi L. (2014). Remarks on the earthworm genus *Helodrilus* Hoffmeister, 1845 with new epigeal and subterranean records (Oligochaeta, Lumbricidae). *Opuscula Zoologica (Budapest)*, 45(2), 181–8.
- Székely, K. (2003). *Magyarország fokozottan védett barlangjai*. Mezőgazda Kiadó. 425 pp.
- Takácsné-Bolner, K., Eszterhás, I., Juhász, M., & S. Kraus (1989). The caves of Hungary. *Karszt és Barlang, special issue*, 17–30.
- Takahashi, Y. & Ebrey, T. G. (2003). Molecular basis of spectral tuning in the newt short wavelength sensitive visual pigment. *Biochemistry*, 42, 6025–34.
- Tellkamp, T. (1844). Ueber den blinden Fisch der Mammuth-Höhle in Kentucky, mit Bemerkungen über einige andere in dieser Höhle lebenden Thiere. (*Muller's*) *Archives für Anatomie und Physiologie*, 1844, 381–95.
- Templeton, A. R., Crandall, K. A. & Sing, C. F. (1992). A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetics*, 132, 619–33.

- Tierney, S. M., Cooper, S. J. B., Saint, K. M., Bertozzi, T., Hyde, J., Humphreys, W. F. & Austin, A. D. (2015). Opsin transcripts of predatory diving beetles: a comparison of surface and subterranean photic niches. *Royal Society Open Science*, 2(1), 140386.
- Tobler, M., Dewitt, T. J., Schlupp, I., García de León, F. J., Herrmann, R., Feulner, P. G. D., Tiedemann, R. & Martin P. (2008). Toxic hydrogen sulfide and dark caves: phenotypic and genetic divergence across two abiotic environmental gradients in *Poecilia mexicana*. *Evolution*, 62, 2643–59.
- Trajano, E. (2012). Ecological classification of subterranean organisms. In: White W.B. & Culver D. C. (Eds.) *Encyclopedia of Caves*. Academic Press, Waltham. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-383832-2.00035-9>
- Trajano, E., Gallão, J. E. & Bichuette, M. E. (2016). Spots of high diversity of troglobites in Brazil: the challenge of measuring subterranean diversity. *Biodiversity and Conservation*, 25, 1805–28. <https://doi.org/10.1007/s10531-016-1151-5>
- Trajano, E. & de Carvalho, M. R. (2017). Towards a biologically meaningful classification of subterranean organisms: a critical analysis of the Schiner-Racovitza system from a historical perspective, difficulties of its application and implications for conservation. *Subterranean Biology*, 22, 1–26.
- Trontelj, P. & Fišer, C. (2009). Cryptic species diversity should not be trivialised. *Systematics and Biodiversity*, 7, 1–3.
- Trontelj, P., Douady, C. J., Fišer, C., Gibert, J., Gorički, Š., Lefébure, T., Sket, B. & Zakšek, V. (2009). A molecular test for cryptic diversity in ground water: how large are the ranges of macro-stygobionts? *Freshwater Biology*, 54, 727–44.
- Trontelj, P., Blejec, A. & Fišer, C. (2012). Ecomorphological convergence of cave communities. *Evolution*, 66, 3852–65.
- Turk. S., Sket, B. & Sarbu, S. (1996). Comparison between some epigeal and hypogean populations of *Asellus aquaticus* (Crustacea: Isopoda: Asellidae). *Hydrobiologia*, 337, 161–70.
- Turner, T. F., Trexler, J. C., Harris, J. L. & Haynes, J. L. (2000). Nested cladistic analysis indicates population fragmentation shapes genetic diversity in a freshwater mussel. *Genetics*, 154, 777–85.

- Väinölä, R., Witt, J. D. S., Grabowski, M., Bradbury, J. H., Jazdzewski, K. & Sket, B., (2008). Global diversity of amphipods (Amphipoda; Crustacea) in freshwater. *Hydrobiologia*, 595, 241–55.
- Valvasor, J. W. (1689). *Die Ehre des Herzogthums Krain*. Ljubljana, Slovenia: Endter. 696 pp.
- Vágvölgyi, J. (1955). A Baradla és a Béke barlang kapcsolatának kérdése zoológiai szempontból. *Földrajzi Értesítő*, 4(4), 427–32.
- Vandel A. (1965). *Biospeleology. The biology of cavernicolous animals*. Oxford (UK): Pergamon Press. 552 pp.
- Varga, L. (1959). Beiträge der Kenntnis der aquatilen Mikrofauna des Baradla-Höhle bei Aggtelek (Biospeologica Hungarica, III). *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 3, 429–41.
- Varga, L. (1963). Weitere Untersuchungen über die aquatile mikrofauna der Baradla-Höhle bei Aggtelek (Ungarn). (Biospeologica Hungarica, XVII). *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 9(3–4), 439–58.
- Vass, I. (1831). *Az Aggteleki-barlang leírása*. Landerer nyomda, Budapest. 82 pp.
- Virág, M. (2016). Történeti áttekintés a budai barlangok keletkezéséről – a klasszikus karsztfejlődéstől a hipogén barlangképződésig. *Karszt és Barlang*, 14, 24–46.
- Verovnik, R., Sket, B. & Trontelj, P. (2004). Phylogeography of subterranean and surface populations of water lice *Asellus aquaticus* (Crustacea: Isopoda). *Molecular Ecology*, 13, 1519–32.
- Verovnik, R., Sket, B. & Trontelj, P. (2005). The colonization of Europe by the freshwater crustacean *Asellus aquaticus* (Crustacea: Isopoda) proceeded from ancient refugia and was directed by habitat connectivity. *Molecular Ecology*, 14, 4355–69.
- Verovnik, R., Prevorčnik, S. & Jugovic, J. (2009). Description of a neotype for *Asellus aquaticus* Linné, 1758 (Crustacea: Isopoda: Asellidae), with description of a new subterranean *Asellus* species from Europe. *Zoologischer Anzeiger*, 248, 101–18.
- Wagner, J. (1931). Vorläufige Mitteilung über die Molluskenfauna der Grotte von Mánfa in Südungarn. *Zoologischer Anzeiger*, 95, 292.
- Wagner, J. (1942). Magyarország barlangjainak puhatestű faunája. (Die Weichtierfauna der ungarischen Höhlen.) *Barlangvilág*, 12, 1–15.
- Wang, I. & Bradburd, G. (2014). Isolation by Environment. *Ecology Letters*, 23, 5649–62.

- West-Eberhard, M.J. (2003). *Developmental plasticity and evolution*. New York, NY: Oxford University Press.
- Whitehurst, I. T. (1991). The *Gammarus:Asellus* ratio as an index of organic pollution. *Water Research*, 25, 333–9.
- Wilkens, H. (1971). Genetic Interpretation of Regressive Evolutionary Processes: Studies on hybrid eyes of two *Astyanax* cave populations (Characidae, Pisces). *Evolution*, 25, 530–44.
- Wilkens, H. (1986). The tempo of regressive evolution—studies of the eye reduction in stygobiont fishes and decapod crustaceans of the gulf-coast and West Atlantic region. *Stygologia*, 2, 130–43.
- Wilkens, H. (1988). Evolution and genetics of epigean and cave *Astyanax fasciatus* (Characidae, Pisces): support for the neutral mutation theory. *Evolutionary Biology*, 23, 271–367.
- Winter, D. J., Trewick, S. A., Waters, J. M. & Spencer, H. G. (2016). The genealogical sorting index and species delimitation [Internet]. 2016 Jan. Report No.: biorxiv;036525v1. Elérhetőség: <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/036525>
- Wright, S. (1943). Isolation by distance. *Genetics*, 28, 114–38.
- Wrzesniowski, A. (1890). Über drei unterirdische Gammariden. *Zeitschrift für wissenschaftliche Zoologie*, 50, 600–724.
- Wyman, J. (1843). Description of a 'Blind Fish,' from a cave in Kentucky. *American Journal of Science*, 45, 94–6.
- Yamamoto, Y. & Jeffery, W. R. (2000). Central role for the lens in cave fish eye degeneration. *Science*, 289, 631–3.
- Yamamoto, Y., Stock, D. W. & Jeffery W.R. (2004). Hedgehog signalling controls eye degeneration in blind cavefish. *Nature*, 431, 844–7.
- Zakšek, V., Sket, B. & Trontelj, P. (2007). Phylogeny of the cave shrimp *Troglocaris*: evidence of a young connection between Balkans and Caucasus. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 42, 223–35.
- Zakšek, V., DeliĆ, T., Fišer, C., Jalžić, B. & Trontelj, P. (2019). Emergence of sympatry in a radiation of subterranean amphipods. *Journal of Biogeography*, 46, 657– 69.

- Zanini, D., Giraldo, D., Warren, B., Katana, R., Andrés, M., Reddy, S., Pauls, S., Schwedhelm-Domeyer, N., Geurten, B. R. H. & Göpfert, M. C. (2018). Proprioceptive opsin functions in *Drosophila* larval locomotion. *Neuron*, 98(1), 67–74.
- Zhang, J., Kumar, S. & Nei, M. (1997). Small-sample tests of episodic adaptive evolution: a case study of primate lysozymes. *Molecular Biology and Evolution*, 14, 1335–8.
- Zicsi, A. (1974). Ein neue Höhlen-Regenwurm (Oligochaeta: Lumbricidae) aus Ungarn. *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 20, 227–32.
- Zicsi, A. (1982). Új állatökológiai kutatások lehetősége az aggteleki Baradla-barlang biológiai laboratóriumában. *Állattani Közlemények*, 69, 1–4, 13–27.
- Zicsi, A. (1983). Etat actuel des recherches du Laboratoire souterrain à Aggtelek, Hongrie. *Mémoires de Biospéologie*, 10, 449–51.
- Zicsi, A., Hevesi, A. & V. Decu (1994). Hongrie. In: C. Juberthie & V. Decu (Eds.): *Encyclopaedia Biospeologica*, T. 1. Société de Biospéologie, Moulis-Bucarest. pp. 719–24.
- Zimmer, M. & Bartholme S. (2003). Bacterial endosymbionts in *Asellus aquaticus* (Isopoda) and *Gammarus pulex* (Amphipoda) and their contribution to digestion. *Limnology and Oceanography*. 48(6), 2208–13.
- Zwickl, D. J. (2006). Genetic algorithm approaches for the phylogenetic analysis of large biological sequence datasets under the maximum likelihood criterion. The University of Texas, Austin; elérhetőség:
<http://molevol.lysine.umiacs.umd.edu/molevolfiles/garli/zwicklDissertation.pdf>

Függelék

taxon	forrás	génszakaszok	lelőhely	x koordináta	y koordináta
<i>N. aggtelekiensis A</i>	vizsgálat	28S 22, COI, H3	Baradla-barlang	20,5440167	48,4831
<i>N. aggtelekiensis B</i>	vizsgálat	28S 22, COI, H3	Rakoczi 1. sz. barlang	20,7488667	48,5208167
<i>N. forroi</i>	vizsgálat	COI, H3	Diabáz-barlang	48,09555	20,482222
<i>N. gebhardti</i>	vizsgálat	28S 22, COI, H3	Abaligeti-barlang	18,115775	46,1373833
<i>N. hrabei</i>	vizsgálat	28S 22, 28S 35, COI, H3	Göd	19,14094	47,715911
<i>N. hungaricus</i>	vizsgálat	28S 22, COI, H3	Borha-völgy, bányatáró	16,4843333	47,3513
<i>N. molnari</i>	vizsgálat	28S 22, COI, H3	Abaligeti-barlang	18,115775	46,1373833
<i>N. sp. nov 1.</i>	vizsgálat	COI, H3	Molnár János-barlang	19,0358	47,5180667
<i>N. sp. nov 2.</i>	vizsgálat	28S 22, 28S 35, COI, H3	Molnár János-barlang	19,0358	47,5180667
<i>N. tatrensis C</i>	vizsgálat	28S 22, 28S 35, COI, H3	Kecske-lyuk	20,63165	48,1175333
<i>N. valachicus</i>	vizsgálat	COI, H3	Farmos	19,826948	47,360811
<i>C. paradoxa</i>	SubBio	28S 35, COI, H3	Torre, Olaszország	13,4015817	45,8383
<i>H. geos</i>	GenBank	28S 22, H3	Cazalla de la Sierra, Spanyolország	-5,759492	37,934658
<i>H. morenoi</i>	GenBank	28S 22, COI, H3	Zaragoza, Spanyolország	0,247727	41,211343
<i>N. aberrans</i>	SubBio	28S 22, 28S 35, H3	Sneberje, Szlovénia	14,5731194	46,0804278
<i>N. aggtelekiensis T98</i>	GenBank	COI	Römersteinbruch bánya, Ausztria	15,558889	46,739167
<i>N. aggtelekiensis C</i>	SubBio	28S 22, 28S 35, COI, H3	Gesause, Ausztria	14,587258	47,565345
<i>N. aitolosi</i>	SubBio	28S 22, 28S 35, COI, H3	Lysimachia-tó, Görögország	21,365575	38,5565389
<i>N. ambulator</i>	SubBio	28S 22, COI, H3	Buco del Piombo, Olaszország	9,198473	45,825819
<i>N. anhihalinus</i>	SubBio	28S 22, 28S 35, COI, H3	Šipun-barlang, Horvátország	18,2179856	42,5836458
<i>N. aquilex A</i>	SubBio	28S 22, 28S 35, H3	Little Stour-folyó, Anglia	1,168921	51,275484
<i>N. aquilex B</i>	SubBio	28S 22, 28S 35, COI, H3	Wavreille, Belgium	5,248482	50,121031
<i>N. arbiter</i>	SubBio	28S 22, 28S 35, COI, H3	Koranu-barlang, Horvátország	15,5403459	45,2152469
<i>N. bajuvaricus</i>	SubBio	28S 22, 28S 35, COI, H3	Lobau, Ausztria	16,516365	48,183362
<i>N. balcanicus</i>	SubBio	28S 22, 28S 35, COI, H3	Vjetrenica-barlang, Bosznia és Hercegovina	17,9838883	42,8458
<i>N. bihorensis B</i>	SubBio	28S 22, 28S 35, COI, H3	Vadu Crișului-barlang, Románia	22,5138789	46,9525167
<i>N. bisitunicus</i>	SubBio	28S 22, COI, H3	Biston-forrás, Irán	47,4666667	34,4166667
<i>N. borisi</i>	SubBio	28S 22, 28S 35, COI, H3	Belghais-forrás, Irán	50,7333333	30,75
<i>N. carniolicus</i>	SubBio	28S 22, 28S 35, COI, H3	Luknja-barlang, Szlovénia	15,0997816	45,818413
<i>N. alpinus</i>	SubBio	28S 22, 28S 35	Ramsauer Tal, Németország	12,900112	47,616669
<i>N. costozae</i>	SubBio	28S 22, 28S 35, COI, H3	Guerra-barlang, Olaszország	11,6	45,483333
<i>N. croaticus</i>	SubBio	28S 22, 28S 35, COI, H3	Zagorske Mrežnice-barlang, Horvátország	15,2206677	45,1971557
<i>N. cvijici</i>	SubBio	28S 22, 28S 35, COI, H3	Popovo polje, Bosznia és Hercegovina	17,986432	42,8940487
<i>N. dalmatinus</i>	SubBio	28S 22, 28S 35, COI, H3	Biba-forrás, Horvátország	15,5705904	43,9489733
<i>N. decui</i>	SubBio	28S 22, COI, H3	Limanu, Románia	28,533012	43,800173
<i>N. delamarei</i>	SubBio	28S 22, 28S 35, H3	Fees-barlang, Franciaország	3,028236	42,910091
<i>N. dimorphus</i>	SubBio	28S 22, 28S 35, H3	Salgyr-források, Ukrajna	34,2816944	44,8548889
<i>N. dobati</i>	SubBio	28S 22, 28S 35, COI, H3	Škocjan-barlang, Szlovénia	14,3055417	45,7909694
<i>N. dobrogicus</i>	SubBio	28S 22, COI, H3	Limanu, Románia	28,5358333	43,8013889
<i>N. dolienianensis</i>	SubBio	28S 22, 28S 35, COI, H3	Torre-folyó, Olaszország	13,4180306	45,8364056
<i>N. factor</i>	SubBio	28S 22, 28S 35, COI, H3	Vjetrenica-barlang, Bosznia és Hercegovina	17,9838883	42,8458
<i>N. fongi</i>	SubBio	28S 22, COI, H3	Dolga-barlang, Szlovénia	14,8300521	45,7122026
<i>N. fontanus A</i>	SubBio	28S 22, 28S 35, COI, H3	Crupet, Belgium	4,961231	50,35009
<i>N. frasassianus</i>	SubBio	28S 22, 28S 35, COI, H3	Frassasi-barlangrendszer, Olaszország	12,9619444	43,4008333

taxon	forrás	génszakaszok	lelőhely	x koordináta	y koordináta
<i>N. gallicus</i>	SubBio	28S 22, 28S 35, COI, H3	Hagieni-forrás, Románia	27,753944	44,64896
<i>N. tatrensis</i> A	SubBio	28S 22, 28S 35	Lodowe-forrás, Lengyelország	19,8695139	49,2616667
<i>N. glenniei</i>	SubBio	28S 22, H3	North Kenwood, Anglia	-3,5342567	50,628487
<i>N. grandii</i>	SubBio	28S 22, 28S 35, COI, H3	Torre-folyó, Olaszország	13,4180306	45,8364056
<i>N. dancaui</i>	GenBank	28S 22, COI	Mangalia, Románia	28,570206	43,819686
<i>N. hadzii</i>	SubBio	28S 22, COI, H3	Oreh-forrás, Szlovénia	14,2996628	45,9525073
<i>N. hercegovinensis</i>	SubBio	28S 22, 28S 35, COI, H3	Žira-barlang, Bosznia és Hercegovina	17,84749	42,92193
<i>N. hosseiniei</i>	SubBio	28S 22, COI, H3	Brolan-forrás, Irán	44,434719	39,376806
<i>N. hvarensis</i> B	SubBio	28S 22, 28S 35, H3	Tršteno, Horvátország	17,9781062	42,7135087
<i>N. illidzensis</i>	SubBio	28S 22, 28S 35, COI, H3	Bosna-forrás, Bosznia és Hercegovina	18,267243	43,8192773
<i>N. karkabounasi</i> H	SubBio	28S 22, 28S 35, COI, H3	Agios Theodoridi-forrás, Görögország	23,1391944	37,9219667
<i>N. kenki</i>	SubBio	28S 22, 28S 35, COI, H3	Sodna vas, Szlovénia	15,5948611	46,1761861
<i>N. kieferi</i>	SubBio	COI, H3	Biberach, Németország	9,790064	48,095088
<i>N. kochianus</i> A	SubBio	28S 22, H3	St Albans, Anglia	-0,338688	51,75227
<i>N. koukourasi</i>	SubBio	28S 22, 28S 35, H3	Louros-forrás, Görögország	20,8411111	39,9319444
<i>N. krameri</i> A	SubBio	28S 22, 28S 35, COI, H3	Stranski-forrás, Horvátország	13,883444	45,284983
<i>N. inopinatus</i>	GenBank	COI	Loosdorf, Ausztria	15,374444	48,205278
<i>N. irlandicus</i>	SubBio	28S 35, COI, H3	Doolin River-barlang, Írország	-9,377577	53,016114
<i>N. laisi</i>	SubBio	28S 22, 28S 35, COI, H3	Lorrach, Németország	7,661749	47,612508
<i>N. likanus</i>	SubBio	28S 22, COI, H3	Đula - Medvedica-forrás, Horvátország	15,2239999	45,2670352
<i>N. lunaris</i>	SubBio	28S 22, 28S 35, COI, H3	Bubanj-forrás, Horvátország	16,6950403	43,5197279
<i>N. miljeticus</i>	SubBio	28S 22, 28S 35, H3	Vodice, Horvátország	17,578154	42,7340332
<i>N. lourensis</i>	SubBio	28S 22, 28S 35, COI,	Louros-forrás, Görögország	20,8411111	39,9319444
<i>N. montanarius</i>	SubBio	28S 22, 28S 35, COI, H3	Frassasi-barlangrendszer, Olaszország	12,9619444	43,4008333
<i>N. multipennatus</i>	SubBio	28S 22, COI, H3	Tomačevo, Szlovénia	14,540575	46,082807
<i>N. orcinus</i>	SubBio	28S 22, 28S 35, COI, H3	Križna-barlang, Szlovénia	14,4672725	45,7451959
<i>N. parapupetta</i>	SubBio	28S 22, H3	Tomačevo, Szlovénia	14,540575	46,082807
<i>N. pectinicauda</i>	SubBio	28S 22, 28S 35, COI, H3	Tomačevo, Szlovénia	14,540575	46,082807
<i>N. montellianus</i>	GenBank	28S 22, COI,	Sorgenti dell'Aso, Olaszország	14,030	42,659
<i>N. persicus</i>	SubBio	28S 22, COI, H3	Tir-e-bagh, Irán	52,6757	30,2339
<i>N. podgoricensis</i>	SubBio	28S 22, COI, H3	Dobro Polje, Montenegró	19,0263889	42,635278
<i>N. podpecanus</i>	SubBio	28S 22, 28S 35, COI, H3	Lučka-barlang, Szlovénia	14,725137	45,9177844
<i>N. plateaui</i>	Genbank	28S 22, COI	Tasso d'Ischitella-barlang, Franciaország	-2,089675	47,440534
<i>N. puteanus</i>	SubBio	28S 22, 28S 35, COI, H3	Walba, Németország	12,035795	48,974567
<i>N. rhenorhodanensis</i> DE	SubBio	28S 22, 28S 35, COI, H3	Cormoran-barlang, Franciaország	5,395144	45,921819
<i>N. salonitanus</i>	SubBio	28S 22, 28S 35, COI, H3	Stomorije, Horvátország	16,3291	43,5698
<i>N. sanctinaumi</i>	SubBio	28S 22, 28S 35, COI, H3	Sv. Naum-forrás, Macedónia	20,740742	40,913819
<i>N. schellenbergi</i>	SubBio	28S 22, 28S 35, COI, H3	Heyd, Belgium	5,570188	50,339593
<i>N. scopicauda</i>	SubBio	28S 22, 28S 35, H3	Huda-barlang, Szlovénia	15,1742514	46,4144648
<i>N. sharifi</i>	SubBio	28S 22, 28S 35, COI, H3	Sarab-e-Robat, Irán	48,3	33,5833333
<i>N. slovenicus</i>	SubBio	28S 22, 28S 35, COI, H3	Stražišče, Szlovénia	14,3376639	46,2271389
N. sp. Guipuzcoa	GenBank	28S 22, COI, H3	Andoain, Spanyolország	-2,226094	43,155066
N. sp. Navarra	GenBank	28S 22, COI, H3	Ias Brujas-barlang, Spanyolország	-1,540539	43,2694
N. sp. Vizcaya	GenBank	28S 22, COI, H3	San Pedro-barlang, Spanyolország	-2,713471	43,373272
N. sp. Brdo	SubBio	28S 22, 28S 35, H3	Brdo, Szlovákia	21,38625	48,8097222
N. sp. Cerova	SubBio	28S 22, H3	Cerova Vrchovina, Szlovákia	20,00573	48,222852

taxon	forrás	génszakaszok	lelőhely	x koordináta	y koordináta
<i>N. sp. Kamenicki</i>	SubBio	28S 22, COI, H3	Kamenicky-patak, Szlovákia	21,4984722	48,7471111
<i>N. stochi</i>	SubBio	28S 22, 28S 35, COI, H3	Krogom-barlang, Szlovénia	13,9261409	45,4524611
<i>N. stygius A</i>	SubBio	28S 22, 28S 35, COI, H3	Jelenska-barlang, Szlovénia	14,3554932	45,9179597
<i>N. tamaninii</i>	SubBio	28S 22, COI, H3	Lago di Pietrarossa, Olaszország	13,56025	45,81481
<i>N. tatrensis B</i>	SubBio	28S 22, COI	Bratislava, Szlovákia	17,109125	48,1478722
<i>N. tauricus</i>	SubBio	28S 22, 28S 35, COI, H3	Partizanski-forrás, Ukrajna	33,8606667	44,4206944
<i>N. thienemanni</i>	SubBio	28S 22, 28S 35, COI, H3	Ruosalper Bach, Svájc	8,8178236	46,9003809
<i>N. timavi</i>	SubBio	28S 22, 28S 35, COI, H3	Postenjška-forrás, Szlovénia	14,2263111	45,6068583
<i>N. transsylvanicus B</i>	SubBio	28S 22, 28S 35, COI, H3	Ciur Izbuc-barlang, Románia	22,392133	46,8497637
<i>N. tridentinus</i>	SubBio	28S 22, 28S 35, COI, H3	Bus Pursi-barlang, Olaszország	10,274194	45,646018
<i>N. vadimi</i>	SubBio	28S 22, 28S 35, COI, H3	Skelska-tó, Ukrajna	33,8685278	44,4605
<i>N. virei C</i>	SubBio	28S 22, 28S 35, COI, H3	Reijmerstok, Hollandia	5,837523	50,800147
<i>N. wolfi A</i>	SubBio	28S 22, 28S 35, COI, H3	Križna-barlang, Szlovénia	14,4672725	45,7451959
<i>N. zagorae</i>	SubBio	28S 22, 28S 35, COI	Kevina-barlang, Horvátország	16,2953319	43,6094935
<i>N. zagrebensis</i>	SubBio	28S 22, 28S 35, COI, H3	Gadina, Szlovénia	15,1820172	45,5646061
<i>P. gorbeanus</i>	SubBio	28S 22, 28S 35, COI, H3	Olaeta, Spanyolország	-2,621613	43,047817

A hazai *Niphargus* fajokat tartalmazó törzsfák készítéséhez felhasznált szekvenciák jegyzéke a források, a génszakaszok, és a lelőhelyek adataival.



EÖTVÖS LORÁND TUDOMÁNYEGYETEM

ADATLAP a doktori értekezés nyilvánosságra hozatalához

I. A doktori értekezés adatai

A szerző neve: Balázs Gergely

A doktori értekezés címe és alcíme: Kolonizáció és adaptáció stygobiont fajoknál

A doktori iskola neve: ELTE Biológiai Doktori Iskola

A doktori iskolán belüli doktori program neve:
Zootaxonómia, állatökológia, hidrobiológia Program

A témavezető neve és tudományos fokozata: Dr. Török János, DsC;
Dr. Herczeg Gábor, DSc

A témavezető munkahelye: ELTE, Állatrendszertani és Ökológiai Tanszék

MTA Adatbázis-azonosító: 10043354

DOI-azonosító¹: 10.15476/ELTE.2019.226

II. Nyilatkozatok

1. A doktori értekezés szerzőjeként²

a) hozzájárok, hogy a doktori fokozat megszerzését követően a doktori értekezésem és a tézisek nyilvánosságra kerüljenek az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban. Felhatalmazom a Természettudományi Kar Dékáni Hivatalának Doktori, Habilitációs és Nemzetközi Ügyek Csoportja ügyintézőjét, hogy az értekezést és a téziseket feltöltse az ELTE Digitális Intézményi Tudástárba, és ennek során kitöltse a feltöltéshez szükséges nyilatkozatokat.

b) kérem, hogy a mellékelt kérelemben részletezett szabadalmi, illetőleg oltalmi bejelentés közzétételéig a doktori értekezést ne bocsássák nyilvánosságra az Egyetemi Könyvtárban és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban;³

c) kérem, hogy a nemzetbiztonsági okból minősített adatot tartalmazó doktori értekezést a minősítés (*dátum*)-ig tartó időtartama alatt ne bocsássák nyilvánosságra az Egyetemi Könyvtárban és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban;⁴

¹ A kari hivatal ügyintézője tölti ki.

² A megfelelő szöveg aláhúzendő.

³ A doktori értekezés benyújtásával egyidejűleg be kell adni a tudományági doktori tanácshoz a szabadalmi, illetőleg oltalmi bejelentést tanúsító okiratot és a nyilvánosságra hozatal elhalasztása iránti kérelmet.

⁴ A doktori értekezés benyújtásával egyidejűleg be kell nyújtani a minősített adatra vonatkozó közokiratot.

d) kérem, hogy a mű kiadására vonatkozó mellékelt kiadó szerződésre tekintettel a doktori értekezést a könyv megjelenéséig ne bocsássák nyilvánosságra az Egyetemi Könyvtárban, és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban csak a könyv bibliográfiai adatait tegyék közzé. Ha a könyv a fokozatszerzést követően egy évig nem jelenik meg, hozzájárulok, hogy a doktori értekezésem és a tézisek nyilvánosságra kerüljenek az Egyetemi Könyvtárban és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban.⁵

2. A doktori értekezés szerzőjeként kijelentem, hogy

a) a ELTE Digitális Intézményi Tudástárba feltöltendő doktori értekezés és a tézisek saját eredeti, önálló szellemi munkám és legjobb tudomásom szerint nem sértem vele senki szerzői jogait;

b) a doktori értekezés és a tézisek nyomtatott változatai és az elektronikus adathordozón benyújtott tartalmak (szöveg és ábrák) mindenben megegyeznek.

3. A doktori értekezés szerzőjeként hozzájárulok a doktori értekezés és a tézisek szövegének plágiumkereső adatbázisba helyezéséhez és plágiumellenőrző vizsgálatok lefuttatásához.

Kelt: Budapest, 2019. szeptember 3.


a doktori értekezés szerzőjének
aláírása

⁵ A doktori értekezés benyújtásával egyidejűleg be kell nyújtani a mű kiadásáról szóló kiadói szerződést.